

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293499 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.09

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.28

(54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ HERV-W ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ
ЛЕЧЕНИИ ПСИХОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 20305561.1
(32) 2020.05.28
(33) EP
(86) PCT/EP2021/064364
(87) WO 2021/239956 2021.12.02
(71) Заявитель:
ЖЕНЁРО СА (CH);
ФОНДАМЕНТАЛЬ (FR)

(72) Изобретатель:
Лебойе Марион, Перрон Эрве (FR)
(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к антителу, направленному против белка оболочки HERV-W (ENV), для применения при лечении группы пациентов с диагнозом психотического заболевания, характеризующихся высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма.

202293499

A1

A1

202293499

АНТИТЕЛО ПРОТИВ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ HERV-W ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПСИХОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к недавно выявленной группе пациентов, у которых ранее было диагностировано психотическое заболевание, в частности шизофрения или биполярное расстройство, причем высокий уровень провоспалительного цитокина в образце жидкости организма этих пациентов делает их подходящими для направленного лечения против белка оболочки HERV-W (HERV-W ENV).

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Психотические расстройства — это генетически обусловленные и обусловленные окружающей средой психические заболевания, которые включают нарушения восприятия, настроения и социальных взаимодействий (1). До сих пор диагнозы психотических расстройств устанавливали клинически и их лечили только химическими соединениями (26, 27, 28).

Хотя патогенетические механизмы, лежащие в основе этих нарушений, до сих пор неясны, недавно было показано, что иммуно-зависимые гены и мобильные генетические элементы являются основными участниками этиопатогенетической цепи (1-3). Мобильные генетические элементы, включающие эндогенные ретровирусы человека (HERV), являются остатками инфекций, имевших место несколько миллионов лет назад, и составляют около 8% генома человека (4). В отличие от их первоначальной классификации как «мусорной» ДНК, способность эндогенных ретровирусов контролировать генные регуляторные сети во время эволюции и развития человеческого мозга (5-8) и их возрастающая ассоциация с основными неврологическими и психическими расстройствами (9, 10) обеспечивают новую концептуальную основу для расшифровки взаимодействий между иммунологическими, генетическими системами и системами мозга. Обычно HERV подавляются клеточными механизмами, но могут активироваться после иммунных проблем и при патологических состояниях (11). Например, отмечено, что у пациентов с диагнозом шизофрении и биполярного расстройства изменена экспрессия гена HERV с различными уровнями транскрипции и образованием белка (1, 12, 13).

В заявках WO2010/0033977A1 и US2019/263895A1, которые однозначно нацелены на лечение рассеянного склероза, в очень общем виде раскрывается, что психотические заболевания, такие как шизофрения или биполярное расстройство, можно лечить с помощью антител, направленных против белка оболочки (ENV) HERV-W (также

называемых здесь анти-HERV-W ENV), поскольку экспрессия HERV-W ENV наблюдалась при психотических заболеваниях, а также при рассеянном склерозе.

Однако вопрос о том, играют ли белки, экспрессируемые генами HERV, такие как белок оболочки, инструментальную роль в психотических расстройствах и, что наиболее важно, у каких пациентов, все еще остается без ответа по причине недостатка знаний в данной области.

Это исключает возможность стабильного назначения целевого лечения у соответствующих пациентов, а нозологические определения психических заболеваний потенциально приводят к созданию гетерогенных популяций без четкой этиологии и с ограниченным пониманием соответствующих механизмов патогенеза (14-16). На сегодняшний день такое отсутствие знаний позволяет ориентироваться только на общие последствия, которые могут модулировать симптоматику пациентов.

Например, изменения передачи сигналов с участием N-метил-D-аспартатных рецепторов (NMDAR) были ассоциированы с расстройствами поведения в когнитивном и сенсомоторном гейтинг-тесте (gating test) (33), которые являются отличительными чертами моделей психоза у грызунов. Таким образом, большинство психомиметических препаратов являются антагонистами рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAR), например, это фенциклидин (1-фенилциклогексилпиперидин), также называемый PCP.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изучая потенциальные клинические и/или биологические корреляции детектирования HERV-W ENV у пациентов с диагнозом шизофрении или биполярного расстройства, авторы изобретения выявили различные группы пациентов с существующими в настоящее время диагнозами. Они выявили подгруппу пациентов со значительно повышенным уровнем цитокина, в частности, в сыворотке, и с детектируемым антигеном HERV-W ENV, и подгруппу без детектируемого антигена HERV-W ENV и без значительных уровней цитокинов. Эти подгруппы, по-видимому, представляют собой подгруппы, определяемые биомаркерами, только одна из которых соответствует патогенности HERV-W ENV, что приводит к различным клиническим исходам. Действительно, различные клинические исходы могут быть связаны с другими патогенными агентами, например синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), представляющим собой многогранное заболевание, вызванное ретровирусом ВИЧ-1 (17).

Таким образом, авторы изобретения впервые обнаружили, что неожиданно среди пациентов с диагнозом психотического заболевания, такого как шизофрения или биполярное расстройство, пациенты, которые действительно экспрессировали HERV-W

ENV, включали не всех пациентов с такими диагнозами, а только определенную подгруппу. Кроме того, они обнаружили, что эта подгруппа пациентов имела значительно более высокий уровень цитокинов в сыворотке по сравнению с другими пациентами с тем же диагнозом.

Это неожиданное открытие представляет собой шаг вперед по сравнению с предшествующим уровнем техники. Действительно, в настоящее время представляется, что не всех пациентов с диагнозом психотического заболевания, такого как шизофрения или биполярное расстройство, можно лечить антителами против HERV-W ENV. Авторы изобретения подчеркнули, что только от 30 до 50% пациентов с диагнозом шизофрении или биполярного расстройства экспрессируют HERV-W ENV (см. фиг. 14C). На основании этих неожиданных результатов авторы определили новую группу пациентов среди пациентов с психотическим заболеванием, используя для этого сочетание основанного на биомаркерах диагноза, а именно экспрессии HERV-W ENV и/или высокого уровня цитокина в образце жидкости организма

Это открытие позволяет выбрать подходящих пациентов для лечения антителами против HERV-W ENV среди всех пациентов с диагнозом психотического заболевания, такого как шизофрения или биполярное расстройство. Соответствующее новое знание сделало возможным исследование терапевтического лечения, основанного на диагностике, для этой подгруппы пациентов. Это представляет собой прорыв в лечении психозов, поскольку в предшествующем уровне техники было невозможно проведение нормативных клинических исследований, демонстрирующих эффективность продуктов, нацеленных на белки HERV, так как, помимо прочего, в патогенезе заболевания около 50% пациентов с диагнозом шизофрении и около 70% с диагнозом биполярного расстройства не участвует HERV-W ENV. Это сделало бы любой статистический анализ эффективности лечения незначимым просто из-за такого невидимого и неизвестного большинства неподходящих пациентов, включенных на основании существующих диагнозов. Таким образом, нельзя было должным образом выбрать и разработать какой-либо конкретный терапевтический продукт, даже если он недостаточно валидирован в клинических исследованиях.

Неожиданно авторы изобретения обнаружили, что применение *in vivo* антитела, нацеленного на HERV-W ENV, может эффективно лечить нейробиологические дисфункции и психотические симптомы у этой подгруппы индивидуумов. Они показали эффективность антитела против HERV-W ENV для лечения этой подгруппы

психотических пациентов, экспрессирующих HERV-W ENV и характеризующихся высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма, в частности, в сыворотке.

Кроме того, авторы изобретения разработали антитело против HERV-W ENV, обладающее преимуществами по сравнению с уже известными антителами против HERV-W ENV. Разработанное антитело распознает конформационный эпитоп и способно индуцировать в нейронах перемещение NMDAR, в частности перемещение рецептора NMDA, содержащего субъединицу GluN2B, в синапсы.

Данная диагностическая терапия в сочетании со свойствами этого нового антитела против HERV-W ENV делает его эффективным средством лечения подгруппы пациентов.

В этом контексте авторы изобретения подчеркнули, что HERV-W ENV изменяет NMDAR-опосредованную синаптическую передачу в сетях гиппокампа, которая, по-видимому, опосредована микроглией и высвобождением провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β или IL-6. Этот процесс вовлекает врожденный иммунитет и провоспалительные цитокины в специфический патогенный путь, запускаемый HERV-W ENV. Глутаматергический рецептор NMDA, содержащий GluN2B, обычно присутствует в синапсах, но было показано, что воздействие HERV-W ENV вызывает неожиданное высвобождение GluN2B из синапсов. Из-за своей биохимической природы, то есть белковой макромолекулы, не ожидалось, что HERV-W ENV будет демонстрировать молекулярные взаимодействия, приводящие к эффектам, подобным тем, которые опосредованы низкомолекулярными химическими соединениями, используемыми для воздействия на рецепторы нейрональных нейротрансмиттеров, но, к своему удивлению, авторы изобретения продемонстрировали его прямое участие в психотическом фенотипе. Делокализация рецепторов NMDA, содержащих GluN2B, делает их нефункциональными в синапсе. Действие белка HERV-W ENV у животных воспроизводило признаки психотических расстройств, таких как шизофрения или биполярное расстройство, и сопровождалось секрецией провоспалительных цитокинов.

Авторы изобретения показали, что HERV-W ENV, обнаруженный у биологически определенной релевантной группы психотических пациентов, способен генерировать дисфункцию в организации NMDAR в сочетании с индукцией продуцирования цитокинов, что влияет на долговременную пластичность глутаматергических синапсов и вызывает поведенческие дефициты, связанные с психозом.

Неожиданно применение антитела против HERV-W ENV предотвращает высвобождение из синапсов и/или индуцирует перемещение в синапсы GluN2B-содержащего глутаматергического рецептора NMDA и, таким образом, оказывает

благоприятное влияние на патогенную дисфункцию синаптической нейротрансмиссии рецептора NMDA. Таким образом, авторы изобретения продемонстрировали, что антитело против HERV-W ENV (также называемого здесь анти-ENV или анти-ENV антителом) может специфически и эффективно обращать патогенные эффекты на уровне GluN2B-содержащего рецептора NMDA, если влияет на его биораспределение по нейронным синапсам под действием HERV-W ENV.

В предшествующем уровне техники ни одна идентифицированная нозологическая подгруппа не могла служить определенным показанием для лечения соответствующих пациентов, то есть пациентов с шизофренией или биполярным расстройством, у которых HERV-W ENV управляет патогенезом, а не пациентов из других подгрупп без HERV-W ENV и участия в патогенезе провоспалительных цитокинов. Таким образом, эффективность лечения психотического заболевания с помощью антител против HERV-W ENV наряду с новым показанием была совершенно неожиданной, поскольку не было указаний на то, что этот белок должен быть нацелен на биологически определенную субпопуляцию пациентов с диагнозом психотического заболевания, и что применение такого антитела, таким образом, может быть нацелено на делекализацию NMDAR, как показано, опосредованную цитокинами, индуцированными HERV-W ENV.

Таким образом, изобретение относится к антителу против HERV-W ENV или к содержащей его фармацевтической композиции, объединенной с диагностическими биомаркерами, обеспечивающими детектирование HERV-W ENV и цитокинов в жидкостях организма, для применения при лечении подгруппы пациентов с диагнозом психотического заболевания, характеризующихся высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма, в частности, в сыворотке, причем указанный цитокин является, в частности, провоспалительным цитокином, более конкретно, IL-6, IL-1 β и/или TNF- α .

В соответствии с конкретным аспектом изобретение относится к способу диагностики для идентификации того, принадлежит ли пациент с диагнозом психотического заболевания к подгруппе пациентов с психотическим заболеванием, как определено в настоящем раскрытии, включающему:

- 1) количественное определение уровня цитокина; и/или
- 2) детектирование экспрессии HERV-W ENV.

В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к способу наблюдения за эффективностью лечения группы пациентов с психотическим заболеванием, характеризующихся высоким уровнем цитокина, который включает

количественное определение указанного цитокина и/или детектирование HERV-W ENV в биологическом образце пациента.

В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к антителу против HERV-W ENV, которое индуцирует в нейронах перемещение рецептора NMDA, содержащего GluN2B, в синапсы и, в частности, которое связывается с конформационным эпитопом HERV-W ENV, определенным двумя отстоящими линейными последовательностями SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, и, более конкретно, которое содержит каждую из областей, определяющих комплементарность (CDR), представленных последовательностями 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 соответствии с еще одним конкретным аспектом изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей указанное антитело против HERV-W ENV и фармацевтически приемлемый эксципиент.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Используемые здесь термины «эндогенный ретровирус человека» и «HERV» относятся к эндогенным ретровирусам человека, которые включают вирус, принадлежащий к семейству эндогенных ретровирусов типа W, обычно называемому «HERV-W».

«HERV-W» представляет собой семейство эндогенных ретровирусов человека, которое было выявлено в геноме человека после первоначального открытия «ретровируса, ассоциированного с рассеянным склерозом», MSRV, ретровируса человека, впервые выделенного из организма пациентов с рассеянным склерозом. Таким образом, когда в исследованиях упоминаются «LM7» (первый изолят, описанный для MS), «MS-ретровирус», «MSRV», «Синцитин», «HERV-W 7q», «ERVW-E1», «ERVW-E2», «копии HERV-W из X-хромосомы» или «HERV-W», все они обозначают элементы HERV-W.

Используемый здесь термин «MSRV» относится к специфическому эндогенному ретровирусу, который является членом семейства HERV-W. В контексте настоящего изобретения аббревиатуры «HERV-W» и «MSRV» обозначают элементы HERV-W. В частности, термины «белок оболочки HERV-W», «HERV-W ENV», «MSRV-ENV» и «ENV» в целом относятся к одним и тем же белкам оболочки. Как правило, несколько возможных вариаций аминокислотной последовательности не препятствуют связыванию специфических антител против ENV для терапевтического применения при психотическом заболевании, связанном с HERV-W ENV.

Используемый здесь термин «лечение» или «процесс лечения» означает реверсию, облегчение, ингибирование развития одного или нескольких симптомов расстройства или заболевания, которое подлежит лечению.

Используемый здесь термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина, то есть к молекулам, которые содержат сайт связывания антигена, специфически связывающий антиген. Как таковой, термин «антитело» следует понимать широко, он охватывает не только молекулы иммуноглобулина, но и фрагменты антител, а также производные антител. В соответствии с конкретным воплощением изобретения антитело представляет собой антитело, направленное против HERV-W ENV и индуцирующее в нейронах перемещение рецептора NMDA, содержащего GluN2B, в синапсы. В соответствии с конкретным воплощением антитело содержит все шесть областей CDR, представленных SEQ ID NO: 1-6.

Используемое здесь понятие «фрагмент антитела» означает часть такого 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 связывания и специфичность указанного антитела. Такие фрагменты являются функциональными эквивалентами указанного антитела и связываются фактически с тем же эпитопом, что и указанное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются указанными, тяжелую цепь, легкую цепь, VL, VH, Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ и F(ab')₂.

Используемое здесь понятие «производное антитела» означает фрагмент антитела по изобретению, предпочтительно включающий шесть CDR указанного антитела, слитых по меньшей мере с одной последовательностью, отличающейся от природной последовательности (например, линкерной последовательностью другого вида), причем указанное производное характеризуется аффинностью связывания и специфичностью к HERV-W ENV, сопоставимыми с таковыми антитела по изобретению. Производные антитела по настоящему изобретению сохраняют аффинность связывания и специфичность указанного антитела. Такие производные являются функциональными эквивалентами указанного антитела и связываются практически с тем же эпитопом, что и указанное антитело. Примеры производных антител включают, но не ограничиваются указанными, scFv, (scFv)₂ и диатела.

В природных антителах две тяжелые цепи (HC) связаны друг с другом дисульфидными связями, и каждая тяжелая цепь связана с легкой цепью (LC) дисульфидной связью. Существует два типа легких цепей: лямбда (l) и каппа (k).

Существует пять основных классов (или изотипов) тяжелых цепей, которые определяют функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепь содержит различные доменные последовательности.

Обычно легкая цепь включает два домена, переменный домен (VL) и константный домен (CL). Тяжелая цепь включает четыре домена, переменный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3, совместно обозначаемые как CH). Переменные области как легкой (VL), так и тяжелой (VH) цепей определяют сайт связывания, специфичный для антигенного эпитопа. Домены константной области легкой (CL) и тяжелой (CH) цепей придают антителу важные биологические свойства, такие как ассоциация цепей антител, секреция, трансплацентарная подвижность, связывание комплемента и связывание с Fc-рецепторами (FcR). Фрагмент Fv представляет собой N-концевую часть фрагмента Fab иммуноглобулина и состоит из переменных частей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Специфичность антитела определяется структурной комплементарностью между сайтом связывания антитела и антигенным эпитопом. Сайты связывания антител состоят из остатков, которые в основном происходят из гиперпеременных или определяющих комплементарность областей (CDR). Определяющие комплементарность области, или CDR, относятся к аминокислотным последовательностям, которые вместе определяют аффинность связывания и специфичность природного Fv-участка сайта связывания нативного иммуноглобулина. Каждая из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина имеет три CDR, обозначаемые CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 соответственно. Таким образом, антигенсвязывающий сайт включает шесть CDR и содержит набор CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепи. Каркасные области (FR) относятся к аминокислотным последовательностям, расположенным между CDR.

Используемый здесь термин «химерное антитело» означает антитело, которое содержит домен VH и домен VL антитела любого вида, предпочтительно мыши, и домен CH и домен CL антитела человека.

В соответствии с изобретением термин «гуманизированное антитело» означает антитело, содержащее FR переменной и константной области антитела человека, но сохраняющему CDR антитела любого вида, предпочтительно мышиного.

Термин «Fab» обозначает фрагмент антитела с молекулярной массой около 50000 и антигенсвязывающей активностью, в котором около половины N-концевого участка H-цепи и вся L-цепь вместе с фрагментами, получаемыми обработкой IgG протеазой папаином, связаны между собой дисульфидными связями.

Используемый здесь термин «F(ab')₂» обозначает фрагмент антитела с молекулярной массой около 100 000 и антигенсвязывающей активностью, которая слегка выше, чем у Fab, в котором шарнирная область связана дисульфидной связью вместе с фрагментами, получаемыми обработкой IgG протеазой пепсином.

Используемый здесь термин «Fab'» обозначает фрагмент антитела с молекулярной массой около 50 000 и антигенсвязывающей активностью, который получают путем расщепления дисульфидной связи в шарнирной области F(ab')₂.

Термины «одноцепочечный Fv» или «scFv» означают полипептид, который представляет собой ковалентно связанный гетеродимер VH::VL и обычно экспрессируется из слитых генов, включающих гены, кодирующие VH и VL, которые связаны линкером, кодирующим пептид. «dsFv» представляет собой гетеродимер VH::VL, стабилизированный дисульфидной связью. Фрагменты двухвалентных и мультивалентных антител могут образовываться либо спонтанно путем ассоциации одновалентных scFv, либо могут быть получены путем связывания одновалентных scFv пептидным линкером, таким как двухвалентный sc(Fv)₂.

Термин «диатела» означает небольшие фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) в одной и той же полипептидной цепи (VH-VL). При использовании слишком короткого линкера, который не позволяет соединить два домена в одной цепи, домены вынуждены связываться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта.

Используемое здесь выражение «антитело по изобретению» означает антитело, направленное против, то есть, специфически связывающееся с белком оболочки HERV-W (HERV-V ENV), предпочтительно направленное против белка HERV-W ENV семейства эндогенных ретровирусов человека типа W (HERV-W), более предпочтительно против белка оболочки MSRВ, более предпочтительно против внеклеточного домена белка оболочки MSRВ. В соответствии с одним воплощением антитело по изобретению представляет собой антитело, направленное против HERV-W ENV и индуцирующее в нейронах перемещение рецептора NMDA, содержащего GluN2B, в синапсы. Антитела по изобретению обычно связывается с конформационным эпитопом.

В частности, антитело по изобретению связывается с конформационным эпитопом, определяемым двумя отстоящими линейными последовательностями, представленными SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11. Предпочтительно, антитело по изобретению содержит все шесть областей CDR, представленных SEQ ID NO: 1 - 6.

В контексте изобретения выражения «антитело против ENV», «антитело против HERV-W ENV», «антитело, направленное против HERV-W ENV» и «антитело, нацеленное на HERV-W ENV» используются взаимозаменяемо и являются эквивалентными.

Используемый здесь термин «биологический образец» означает любой биологический образец, полученный с целью оценки *in vitro*. В настоящем изобретении образец или образец пациента могут содержать любую жидкость организма или ткань, специфичные для заболевания или поражения. Примеры жидкостей организма включают кровь, жидкость из сосков молочной железы, мочу, слюну, синовиальную жидкость и спинномозговую жидкость (CSF). В частности, образец крови может быть сывороткой или плазмой

Применение антител против HERV W ENV и диагностических биомаркеров для лечения психотического заболевания

Настоящее изобретение относится к определяемому диагностикой терапевтическому лечению пациентов с диагнозом психотического заболевания, причем указанные пациенты прошли тестирование на биомаркеры, показавшее высокий уровень цитокина в образце жидкости организма и/или экспрессию HERV-W ENV в образце жидкости организма, и далее получают лечение антителом, направленным против белка оболочки HERV-W (антитело против HERV-W ENV).

В частности, настоящее изобретение относится к антителу против HERV-W ENV для применения при лечении группы пациентов с диагнозом психотического заболевания и имеющих высокий уровень цитокина в образце жидкости организма, в частности в образце крови, более конкретно в сыворотке или плазме.

В частности, настоящее изобретение относится к антителу против HERV-W ENV для применения при лечении группы пациентов с диагнозом психотического заболевания и характеризующихся высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма, в частности, в образце крови, более конкретно, в сыворотке или плазме.

В настоящем изобретении выражения «группа пациентов», «подгруппа пациентов» и «кластер пациентов» используются взаимозаменяемо и являются эквивалентными.

Пациент с психотическим заболеванием является пациентом с психотическими симптомами или пациентом, у которого диагностировано психотическое заболевание.

Иными словами, пациент с диагнозом психотического заболевания - это пациент, страдающий от психотического заболевания с психотическими симптомами, которому практикующим врачом поставлен клинический диагноз.

В частности, указанное психотическое заболевание выбрано из группы, состоящей из шизофрении, биполярного расстройства, шизоаффективного психоза и шизофреноформного расстройства. Эти патологии определяются в соответствии с классификацией DSM IV или V или соответствующей классификацией психотических заболеваний (25-28). Диагноз психотического заболевания, и, более конкретно, заболевания из этого списка психотических заболеваний, хорошо известен практикующим врачам. Более конкретно, указанное психотическое заболевание представляет собой шизофрению или биполярное расстройство.

В настоящем изобретении понятие «имеющий высокий уровень цитокина» означает, что пациент «по результатам тестирования имеет высокий уровень цитокина» или «характеризуется высоким уровнем цитокина».

«Высокий уровень цитокина» или «повышенный уровень цитокина» здесь означает, что уровень указанного цитокина в группе пациентов значительно выше, чем у здоровых людей. Например, высокий уровень цитокина представляет собой уровень цитокина выше 0,5 пг/мл для IL-6 в сыворотке, выше 0,05 пг/мл для IL-1 β в сыворотке, выше 1,25 пг/мл для TNF- α в сыворотке. Следует отметить, что пороговые значения цитокинов, процитированные в настоящем описании, варьируют в зависимости от наборов, антител, методик, протоколов, устройств и платформ, используемых для определения содержания цитокинов, а также от их чувствительности (доля истинно-положительных результатов) и специфичности (доля истинно-отрицательных результатов). Представленные значения являются только ориентировочными, и их следует адаптировать в соответствии с инструкциями производителей или оценивать с помощью заданной платформы с участием здоровых добровольцев. Иными словами, это означает, что уровень указанного цитокина в группе пациентов значительно выше нормального уровня указанного цитокина. Это нормальное значение предоставляется поставщиками наборов и/или может быть определено на панели здоровых добровольцев, у которых подтверждено отсутствие какой-либо возможной начальной или продолжающейся инфекции или воспаления. Специалист в данной области прекрасно знает, как измерить и как определить такой пороговый или нормальный уровень для данного цитокина с использованием различных методик, протоколов и устройств, доступных на рынке.

Это определение применимо к высоким уровням специфических цитокинов (таких как IL-6, IL-1 β и TNF- α), указанных в настоящем описании. Как правило, уровень цитокина измеряют в образце жидкости организма, в частности в образце крови, более конкретно в сыворотке или в плазме.

В настоящем изобретении указанный цитокин, в частности, является провоспалительным цитокином. Более конкретно, указанный провоспалительный цитокин выбран из группы, состоящей из IL-6, IL-1 β и TNF- α .

Таким образом, в соответствии с конкретным воплощением, настоящее изобретение относится к антителу против HERV-W ENV для применения при лечении группы пациентов с диагнозом психотического заболевания и имеющих высокий уровень цитокина в образце жидкости организма, в частности в образце крови, более конкретно в сыворотке, причем указанный цитокин является, в частности, провоспалительным цитокином, более конкретно, IL-6, IL-1 β и/или TNF- α .

В соответствии с конкретным воплощением, настоящее изобретение относится к антителу против HERV-W ENV для применения при лечении группы пациентов с диагнозом психотического заболевания и характеризующихся высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма, в частности в образце крови, более конкретно в сыворотке, причем указанный цитокин является, в частности, провоспалительным цитокином, более конкретно, IL-6, IL-1 β и/или TNF- α .

В соответствии с конкретным воплощением указанное психотическое заболевание является шизофренией, и указанный цитокин с высоким уровнем в образце жидкости организма предпочтительно является IL-6.

В соответствии с конкретным воплощением указанное психотическое заболевание является биполярным расстройством, и указанный цитокин с высоким уровнем в образце жидкости организма предпочтительно является IL-1 β . В соответствии с более конкретным воплощением указанная группа пациентов с диагнозом биполярного расстройства и имеющих высокий уровень IL-1 β в образце жидкости организма дополнительно имеет высокий уровень TNF- α в образце жидкости организма.

В соответствии с конкретным воплощением ENV HERV-W был обнаружен у пациентов указанной группы. Так как подгруппа пациентов, показывающих высокий уровень цитокинов, соответствует подгруппе пациентов, экспрессирующих ENV HERV-W, детектирование ENV HERV-W не является обязательным и может быть дополнительным анализом. В частности, HERV-W ENV определяют в биологическом образце. Более конкретно, HERV-W ENV определяют в образце крови, более конкретно в сыворотке или в плазме. HERV-W ENV определяют с использованием антитела против HERV-W ENV, такого как антитело против HERV-W ENV в соответствии с настоящим изобретением.

Экспрессия HERV-W ENV может быть охарактеризована путем детектирования ДНК, РНК, антигена или белка HERV-W в соответствии с нижеописанными условиями.

Семейство HERV-W было открыто после MSRV, ретровируса человека, впервые выделенного у пациентов с рассеянным склерозом (18-20). Детектирование экспрессии HERV-W ENV хорошо известно специалисту в данной области. Ассоциированные заболевания или синдромы определяют по наличию у соответствующих пациентов либо (i) специфической РНК HERV-W или антигенов, предпочтительно обнаруживаемых в жидкостях организма (кровь, спинномозговая жидкость, моча), либо (ii) повышенного количества копий ДНК или РНК в клетках или тканях органов с поражениями или дисфункциями, либо (iii) специфических белков MSRV/HERV-W или антигенов в клетках или тканях, вовлеченных в процесс заболевания или в клинический синдром, либо (iv) HERV-W-белков или антигенов в жидкостях организма индивидуумов с заболеванием или с выраженным клиническим синдромом (см. международную заявку WO2019201908A1 – «Способ детектирования растворимой гидрофильной олигомерной формы белка оболочки HERV-W»). Примеры таких анализов по детектированию в различных технических условиях и с различными целями были описаны в уровне техники (21-23). Все эти условия детектирования исключают детектирование физиологического числа копий HERV-W и синцитина-1 при экспрессии в норме и физиологических условиях, т.е. во время беременности (24).

В частности, в настоящем изобретении экспрессию HERV-W ENV осуществляют путем детектирования белка HERV-W ENV в образце. Для такого детектирования можно использовать антитело против HERV-W ENV. Более конкретно, указанное антитело против HERV-W ENV может быть одним из тех, которые описаны в настоящей заявке.

Дополнительно, это может быть мышинное антитело, содержащее:

- вариабельную область легкой цепи (VL), представленную SEQ ID NO: 7; а также
- вариабельную область тяжелой цепи (VH), представленную SEQ ID NO: 8.

Вышеуказанные вариабельные области легкой и тяжелой цепи раскрыты в таблице 1.

Таблица 1: Вариабельные области легкой и тяжелой цепи мышинного антитела

Домен	SEQ ID NO:	Последовательность
VL	7	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHSGITYLYWFL QKPGQSPQLLIYQMSHLASGVDPDRFSSSGSGTDFTLRISRVE AEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGTKLEIK
VH	8	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTSYWMHWIKQ RPGQGLEWIGAIYPGKSDTSYNQKFKGKAKLTAVTSASTA YMELTSLTNEDSAVYYCTRTVYAMDYWGQGTSVTVSS

В соответствии с таким воплощением психотическое заболевание можно также назвать «психотическое заболевание, ассоциированное с HERV-W ENV». В таком случае среди пациентов с психотическим заболеванием указанная группа пациентов представляет собой группу пациентов с психотическим заболеванием, имеющих высокий уровень цитокина в образце жидкости организма, в частности, IL-6, IL-1 β и/или TNF- α , и где HERV-W ENV был обнаружен, например, путем детектирования ДНК, РНК, антигена или белка HERV-W в соответствии с описанными выше условиями. В соответствии с конкретным воплощением настоящее изобретение относится к группе пациентов с психотическим заболеванием, у которых метод детектирования HERV-W ENV включает детектирование ДНК, РНК, антигена или белка HERV-W и/или высокого уровня цитокина в образце жидкости организма.

Таким образом, в соответствии с конкретным воплощением настоящее изобретение относится к антителу против HERV-W ENV для применения при лечении группы пациентов с диагнозом психотического заболевания, имеющих высокий уровень цитокина в образце жидкости организма, в частности в образце крови, более конкретно в сыворотке или плазме, и/или имеющих экспрессию HERV-W ENV, определяемую в образце жидкости организма, в частности в образце крови, более конкретно в сыворотке или плазме.

В соответствии с конкретным воплощением настоящее изобретение относится к антителу против HERV-W ENV для применения при лечении группы пациентов с диагнозом психотического заболевания, характеризующихся высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма, в частности в образце крови, более конкретно в сыворотке или плазме, и/или имеющих экспрессию HERV-W ENV, детектируемую в образце жидкости организма, в частности в образце крови, более конкретно в сыворотке или плазме.

В соответствии с конкретным воплощением настоящее изобретение относится к антителу против HERV-W ENV для применения при лечении группы пациентов, как указано выше, где указанное антитело против HERV-W ENV индуцирует перемещение содержащегося в нейронах NMDA-рецептора, в частности GluN2B-содержащего NMDA-рецептора, в синапсы.

Это означает, что указанное антитело против HERV-W ENV способно обратить высвобождение NMDAR из нейрональных синапсов, параллельно с продуцированием цитокинов микроглией, при этом данные нейрорецепторы могут восстановить нормальную функциональную активность. Это относится, в частности, к

глутаматергическому GluN2B-содержащему NMDA-рецептору. Фактически, как показано в примере 2, HERV-W ENV вызывает утрату функциональной активности NMDAR, индуцируя его делокализацию из физиологически релевантной синаптической области. Это специфическое удаление NMDA-рецептора, содержащего GluN2B, из синапсов в постсинаптический компартмент (т. е. в области нейрональной мембраны за пределами синапсов) приводит к характерным симптомам психотических расстройств.

В целом, пример 2 показывает, как идентифицировать терапевтическую активность антитела против HERV-W в отношении перемещения NMDA-рецептора, содержащего GluN2B, из постсинаптического компартмента в синапсы между нейронами гиппокампа. Гиппокампы животных широко используются в неврологии, поскольку они представляют собой модель животных клеток для изучения психотических расстройств и соответствуют легкодоступной области мозга.

Поскольку нейроны в гиппокампе эквивалентны нейронам, обнаруженным в других областях мозга, в отношении их глобальных синаптических функций и их потребности в синаптической локализации рецепторов рядом с нейротрансмиттерами, наблюдения, сделанные на нейронах гиппокампа, экстраполируются на нейроны в других областях мозга. Таким образом, хотя области мозга, вовлеченные в различные психотические патологии, могут различаться, настоящие наблюдения, сделанные на нейронах гиппокампа, являются репрезентативными для нейронов, расположенных в других областях мозга.

В соответствии с конкретным воплощением настоящее изобретение относится к антителу против HERV-W ENV для применения при лечении группы пациентов, как указано выше, где указанное антитело связывается с HERV-W ENV.

В соответствии с конкретным воплощением настоящее изобретение относится к антителу против HERV-W ENV для применения при лечении группы пациентов, как указано выше, где указанное антитело связывается с конформационным эпитопом HERV-W ENV. Более конкретно, указанный конформационный эпитоп определяется двумя отстоящими линейными последовательностями, представленными SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

В соответствии с конкретным воплощением настоящее изобретение относится к антителу против HERV-W ENV для применения при лечении группы пациентов, как указано выше, где указанное антитело содержит каждую из шести областей CDR, представленных 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 соответствии с конкретным воплощением настоящее изобретение относится к антителу против HERV-W ENV для использования при лечении группы пациентов, как указано выше, где указанное антитело индуцирует в нейронах перемещение NMDA-рецептора, в частности, NMDA-рецептора, содержащего субъединицу GluN2B, в синапсы, где указанное антитело содержит каждую из шести областей CDR, представленных 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 соответствии с конкретным воплощением настоящее изобретение относится к антителу против HERV-W ENV для применения при лечении группы пациентов, как указано выше, где указанное антитело индуцирует в нейронах перемещение NMDA-рецептора, в частности, NMDA-рецептора, содержащего субъединицу GluN2B, в синапсы, где указанное антитело специфически связывается с конформационным эпитопом, определяемым двумя отстоящими линейными последовательностями, представленными SEQ ID NO: 10 и в SEQ ID NO: 11, и содержит каждую из шести областей CDR, представленных 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 соответствии с конкретным воплощением указанное антитело против HERV-W для применения при лечении группы пациентов, как указано выше, представляет собой моноклональное антитело или гуманизированное моноклональное антитело. Более конкретно, указанное антитело представляет собой IgG, такой как IgG1 или IgG4. Более конкретно, это гуманизированное моноклональное антитело IgG4 или моноклональное антитело IgG1.

В соответствии с конкретным воплощением указанное антитело против HERV-W для применения при лечении группы пациентов, как указано выше, содержит:

- легкую цепь, где переменный домен (VL) содержит каждую из трех областей CDR, как показано в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, SEQ ID NO: 2 для CDR-L2 и SEQ ID NO: 3 для CDR-L3; а также

- тяжелую цепь, где переменный домен (VH) содержит каждую из трех областей CDR, как показано в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, SEQ ID NO: 5 для CDR-H2 и SEQ ID NO: 6 для CDR-H3.

Антитело также может быть фрагментом или производным антитела против HERV-W, описанного выше, выбранным из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ и диатела.

Способ диагностики для идентификации подгруппы пациентов с диагнозом психотического заболевания

Настоящая заявка также относится к способу диагностики для определения того, принадлежит ли пациент с диагнозом психотического заболевания к подгруппе пациентов с психотическим заболеванием, как определено в настоящем раскрытии, включающему:

- 1) количественное определение уровня цитокина и/или
- 2) детектирование экспрессии HERV-W ENV.

В частности, указанный цитокин представляет собой провоспалительный цитокин, более конкретно IL-6, IL-1 β и/или TNF- α .

В частности, психотическое заболевание выбрано из группы, состоящей из шизофрении, биполярного расстройства, шизоаффективного психоза и шизофреноформного расстройства.

Например, если у пациента диагностирована шизофрения, предпочтительно количественно определяют уровень IL-6. Например, если у пациента диагностировано биполярное расстройство, предпочтительно количественно определяют уровень IL-1 β . В случае биполярного расстройства в дополнение можно также количественно определить уровень TNF- α .

Как правило, уровень цитокина количественно определяют в образце жидкости организма, в частности, в образце крови, более конкретно, в сыворотке или плазме.

Если у пациента наблюдается высокий уровень указанного цитокина в образце жидкости организма, это означает, что указанный пациент принадлежит к подгруппе пациентов с психотическим заболеванием и характеризуется высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма, а также характеризуется экспрессией HERV-W ENV.

Здесь также применим приведенный выше термин «высокий уровень цитокина».

Примеры способов детектирования HERV-W ENV приведены ранее в настоящем описании. В частности, экспрессию HERV-W ENV определяют путем детектирования белка HERV-W ENV в биологическом образце. Для этого можно использовать антитело против HERV-W ENV. Более конкретно, указанное антитело против HERV-W ENV может быть антителом, описанным в настоящей заявке.

Дополнительно, это может быть мышинное антитело, содержащее:

- вариабельную область легкой цепи (VL), представленную SEQ ID NO: 7; а также
- вариабельную область тяжелой цепи (VH), представленную SEQ ID NO: 8.

В настоящем изобретении HERV-W ENV детектируется в биологическом образце, в частности, в образце жидкости организма, таком как образец крови, более конкретно, в сыворотке или в плазме. Поскольку подгруппа пациентов с высоким уровнем цитокина соответствует подгруппе пациентов, экспрессирующих HERV-W ENV, т.е. подгруппе

пациентов, у которых обнаружен HERV-W ENV, идентификация этой подгруппы пациентов с психотическим заболеванием не требует как количественного определения уровня цитокина, так и детектирования HERV-W ENV. Таким образом, достаточно анализа только одного из этих параметров.

Таким образом, в соответствии с конкретным воплощением настоящая заявка относится к способу диагностики для определения того, относится ли пациент с диагнозом психотического заболевания к подгруппе пациентов с психотическим заболеванием, характеризующихся высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма, включающему:

1) количественное определение уровня цитокина, в частности, в образце крови, более конкретно в сыворотке, причем указанный цитокин представляет собой, в частности, провоспалительный цитокин, такой как IL-6, IL-1 β и/или TNF- α , и

2) необязательное детектирование экспрессии HERV-W ENV.

Изобретение дополнительно относится к мышиному антителу, содержащему:

- вариабельную область легкой цепи (VL), представленную SEQ ID NO: 7; а также
- вариабельную область тяжелой цепи (VH), представленную SEQ ID NO: 8.

Указанное мышиное антитело содержит CDR SEQ ID NO: 1-6.

Изобретение дополнительно относится к набору для детектирования HERV-W ENV в биологическом образце, в частности в образце жидкости организма, таком как образец крови, более конкретно в сыворотке или плазме, содержащему антитело против HERV-W ENV как описано в настоящем изобретении. В частности, набор содержит антитело против HERV-W ENV, содержащее каждую из шести областей CDR, представленных 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.

Более конкретно, набор содержит антитело против HERV-W ENV, содержащее:

- легкую цепь, где вариабельный домен (VL) содержит каждую из трех областей CDR, как показано в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, SEQ ID NO: 2 для CDR-L2 и SEQ ID NO: 3 для CDR-L3; а также

- тяжелую цепь, где вариабельный домен (VH) содержит каждую из трех областей CDR, как показано в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, SEQ ID NO: 5 для CDR-H2 и SEQ ID NO: 6 для CDR-H3

Набор может также содержать мышиное антитело, содержащее:

- вариабельную область легкой цепи (VL), представленную SEQ ID NO: 7; а также
- вариабельную область тяжелой цепи (VH), представленную SEQ ID NO: 8.

Терапевтический способ и способ мониторинга по изобретению

В соответствии с другим аспектом изобретение также относится к способу лечения группы пациентов с диагнозом психотического заболевания, такого как шизофрения или биполярное расстройство, и характеризующихся высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма, содержащему введение указанным пациентам эффективного количества антитела против HERV-W ENV, в частности, такого, как описано в настоящем изобретении.

В частности, изобретение относится к способу лечения группы пациентов с диагнозом психотического заболевания, такого как шизофрения или биполярное расстройство, и характеризующихся:

- высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма и/или
- экспрессией HERV-W ENV, детектируемой в образце жидкости организма, включающему введение указанным пациентам эффективного количества антитела против HERV-W ENV, в частности, такого, как описано в настоящем изобретении.

В соответствии с другим аспектом изобретение также относится к применению антитела против HERV-W ENV, такого как антитело, описанное в настоящем изобретении, для производства лекарственного средства для лечения группы пациентов с диагнозом психотического заболевания, имеющих высокий уровень цитокина в образце жидкости организма.

В частности, изобретение также относится к применению антитела против HERV-W ENV, такого как антитело, описанное в настоящем изобретении, для производства лекарственного средства для лечения группы пациентов с диагнозом психотического заболевания, характеризующихся:

- высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма и/или
- экспрессией HERV-W ENV, детектируемой в образце жидкости организма.

Изобретение также относится к способу лечения группы пациентов с диагнозом психотического заболевания, характеризующихся:

- высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма и/или
- экспрессией HERV-W ENV, детектируемой в образце жидкости организма, включающему введение указанным пациентам эффективного количества антитела против HERV-W ENV, в частности антитела против HERV-W ENV, содержащего каждую из шести областей CDR, представленных 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.

Все описанные выше воплощения применимы к другим аспектам изобретения.

В частности, изобретение также относится к способу лечения пациента с диагнозом психотического заболевания, включающему следующие стадии:

- 1) количественное определение уровня цитокина; и/или
- 2) детектирование экспрессии HERV-W ENV.

В частности, указанный цитокин представляет собой провоспалительный цитокин, более конкретно IL-6, IL-1 β и/или TNF- α . В частности, уровень указанного цитокина количественно определяют в образце крови, более конкретно, в сыворотке или плазме. Для количественного определения уровня цитокина можно использовать один или несколько специфических биомаркеров указанного цитокина. Для детектирования экспрессии HERV-W ENV можно использовать антитело против HERV-W ENV, такое как антитело, описанное в настоящем изобретении. HERV-W ENV детектируется в биологическом образце, в частности, в образце жидкости организма, таком как образец крови, более конкретно, в сыворотке или плазме.

Если указанная стадия 1 демонстрирует высокий уровень цитокина в образце жидкости организма, и/или если на указанной стадии 2 детектируется HERV-W ENV, то способ по изобретению дополнительно содержит стадию предоставления антитела, раскрытого в настоящей заявке, указанному пациенту. Следует отметить, что предпочтительно сначала осуществляют стадию 1. В соответствии с этим воплощением, если стадия 1 демонстрирует высокий уровень цитокина в образце жидкости организма, стадия 2 может быть необязательной.

Для определения «высокого уровня цитокина» здесь также применимо приведенное выше определение термина «высокий уровень цитокина».

Далее можно осуществлять последующее наблюдение с использованием специфических биомаркеров цитокина(ов), релевантных для пациента, или антитела против HERV-W ENV, такого как раскрытое в настоящей заявке.

В соответствии с конкретным воплощением изобретение также относится к способу лечения пациента с диагнозом шизофрении, включающему следующие стадии:

- 1) количественное определение уровня IL-6; и/или
- 2) детектирование экспрессии HERV-W ENV.

Если указанная стадия 1 показывает высокий уровень IL-6, и/или если на указанной стадии 2 детектируется HERV-W ENV, то способ по изобретению дополнительно содержит стадию обеспечения антителом по изобретению указанного пациента (стадию введения антитела по изобретению указанному пациенту).

В соответствии с конкретным воплощением изобретение также относится к способу лечения пациента с диагнозом биполярного расстройства, включающему следующие стадии:

- 1) количественное определение уровня IL-1 β ; и/или
- 2) детектирование экспрессии HERV-W ENV;
- 3) необязательное количественное определение уровня TNF- α .

Если указанная стадия 1 показывает высокий уровень IL-1 β и/или если на указанной стадии 2 детектируется HERV-W ENV, и необязательная стадия 3 показывает высокий уровень TNF- α , то способ по изобретению дополнительно содержит стадию обеспечения антителом по изобретению указанного пациента.

Изобретение также относится к способу мониторинга ответа на лечение пациента с диагнозом психотического заболевания, имеющего высокий уровень цитокина в образце жидкости организма, причем указанный способ содержит следующие этапы:

- 1) количественное определение уровня цитокина; и/или
- 2) детектирование белка HERV-W ENV.

В частности, указанный цитокин представляет собой провоспалительный цитокин, более конкретно IL-6, IL-1 β и/или TNF- α . В частности, уровень цитокина количественно определяют в образце крови, более конкретно, в сыворотке или плазме. Для количественного определения уровня цитокина можно использовать один или несколько специфических биомаркеров указанного цитокина. Для детектирования экспрессии HERV-W ENV можно использовать антитело против HERV-W ENV, такое как антитело, описанное в настоящей заявке. HERV-W ENV детектируется в биологическом образце, в частности, в образце жидкости организма, таком как образец крови, более конкретно, в сыворотке или плазме. Например, если психотическое заболевание представляет собой шизофрению, указанный цитокин предпочтительно представляет собой IL-6. Например, если указанное психотическое заболевание представляет собой биполярное расстройство, указанный цитокин предпочтительно представляет собой IL-1 β и возможно дополнительно предпочтительно TNF- α .

Снижение уровня цитокинов и/или снижение белка HERV-W ENV у пациента являются показателями эффективности лечения. Дополнительно, могут быть проведены поведенческие исследования и/или исследования по шкале клинической оценки пациентов для анализа улучшения общего состояния пациентов и, таким образом, для подтверждения эффективности лечения и/или для адаптации его дозировки к пациенту.

Как правило, в настоящей заявке стадия детектирования и/или количественного определения может выполняться согласно плановым методикам, хорошо известным специалистам в данной области. Обычно, указанная стадия включает приведение в контакт биологического образца, такого как образец жидкости организма пациента, с селективными реагентами, такими как зонды, праймеры, лиганды или антитела, и, таким образом, детектирование наличия представляющих интерес нуклеиновых кислот или белков, изначально присутствующих в образце.

Антитело против HERV-W ENV

Настоящее изобретение также относится к антителу, направленному против HERV-W ENV и вызывающему в нейронах перемещение NMDAR, в частности NMDA-рецептора, содержащего субъединицу GluN2B, в синапсы.

В нейронах существует два основных подтипа NMDA-рецептора (также обозначаемого NMDAR). NMDAR, который содержит субъединицу GluN2A, называется GluN2A-содержащим NMDA-рецептором (GluN2A-NMDAR), и NMDAR, который содержит субъединицу GluN2B, называется GluN2B-содержащим NMDA-рецептором (GluN2B-NMDAR).

Настоящее изобретение также относится к антителу против HERV-W ENV, связывающемуся с конформационным эпитопом HERV-W ENV.

Термин «конформационный» противоположен по значению термину «линейный». В настоящем изобретении это означает, что эпитоп рассматривается как две отдельные и отстоящие друг от друга линейные аминокислотные последовательности, которые в значительной степени обнаруживаются одним и тем же моноклональным антителом в классических протоколах картирования эпитопов с перекрывающимися пептидами, охватывающими первичную аминокислотную последовательность белка. Конформационный эпитоп образуется, когда белок сворачивается в специфическую трехмерную форму, которая представляет эти две отстоящие аминокислотные последовательности как смежные, тем самым создавая уникальный эпитоп, содержащий объединенные последовательности.

Предпочтительно антитело против HERV-W ENV связывается с конформационным эпитопом HERV-W ENV, создаваемым двумя отстоящими линейными последовательностями, представленными SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11.

Специалисту в данной области техники хорошо известно, как получать антитела, связывающиеся со специфическим эпитопом, определяемым его аминокислотной последовательностью (29).

Настоящее изобретение также относится к антителу, содержащему каждую из определяющих комплементарность областей (CDR), представленных 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.

Настоящее изобретение также относится к антителу против HERV-W ENV, которое индуцирует в нейронах перемещение NMDA-рецептора, содержащего GluN2B, в синапсы и которое содержит каждую из определяющих комплементарность областей (CDR), представленных 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.

Настоящее изобретение также относится к антителу против HERV-W ENV, которое индуцирует в нейронах перемещение NMDA-рецептора, содержащего GluN2B, в синапсы и которое связывается с конформационным эпитопом HERV-W ENV, образуемым двумя отстоящими линейными последовательностями, представленными SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

Настоящее изобретение также относится к антителу против HERV-W ENV, связывающемуся с конформационным эпитопом HERV-W ENV, образуемым двумя отстоящими линейными последовательностями, представленными SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, и содержащему каждую из определяющих комплементарность областей (CDR), представленных 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.

Настоящее изобретение также относится к антителу против HERV-W ENV, связывающемуся с конформационным эпитопом HERV-W ENV, образуемым двумя отстоящими линейными последовательностями, представленными SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, и содержащему каждую из определяющих комплементарность областей (CDR), представленных 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, и которое индуцирует в нейронах перемещение GluN2B-содержащего NMDA-рецептора в синапсы.

В соответствии с одним воплощением антитело по изобретению содержит:

- легкую цепь, где переменный домен (VL) содержит каждую из трех областей CDR, как показано в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, SEQ ID NO: 2 для CDR-L2 и SEQ ID NO: 3 для CDR-L3; а также
- тяжелую цепь, в которой переменный домен (VH) содержит каждую из трех областей CDR, как показано в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, SEQ ID NO: 5 для CDR-H2 и SEQ ID NO: 6 для CDR-H3

Вышеуказанные определяющие комплементарность области (CDR) раскрыты в таблице 2.

Таблица 2: CDR-домены антитела по изобретению

Домены	SEQ ID NO:	Последовательность
CDR-L1	1	KSLHSHKGITY
CDR-L2	2	QMS
CDR-L3	3	AQNLELPWT
CDR-H1	4	GYSFTSYW
CDR-H2	5	IYPGKSDTS
CDR-H3	6	TRTVYAMDY

В соответствии с одним воплощением настоящее изобретение относится к фрагменту или производному антитела, описанного выше, выбранному из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ и диатела.

В соответствии с предпочтительным воплощением антитело по изобретению представляет собой моноклональное антитело. Моноклональные антитела по изобретению являются одновалентными, двухвалентными, поливалентными, моноспецифическими или биспецифическими. В соответствии с другим воплощением антитело, направленное против HERV-W ENV, представляет собой связывающий фрагмент или конъюгат. Например, антитела по изобретению могут быть конъюгированы с агентом, ингибирующим рост, цитотоксическим агентом или ферментом, активирующим пролекарство.

Еще один тип аминокислотной модификации антитела по изобретению может быть полезен для изменения исходного профиля гликозилирования антитела. Под «изменением» понимают удаление одного или более углеводных фрагментов антитела, и/или добавление одного или более сайтов гликозилирования, отсутствующих в антителе. Гликозилирование антител обычно является N-связанным. Термин «N-связанный» характеризует присоединение углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X означает любую аминокислоту, кроме 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, чтобы она содержала одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования).

В соответствии с конкретным воплощением антитело против HERV-W ENV по изобретению представляет собой моноклональное антитело, химерное моноклональное антитело или гуманизированное моноклональное антитело.

Предпочтительно указанное антитело против HERV-W ENV представляет собой IgG, в частности IgG1 или IgG4, предпочтительно IgG4.

Более предпочтительно, антитело по изобретению представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, более предпочтительно гуманизированное моноклональное антитело IgG4 или гуманизированное моноклональное антитело IgG1.

Указанное гуманизированное антитело может быть создано путем получения последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих домены CDR, их встраивания в вектор экспрессии для клеток животных, содержащих гены, кодирующие константную область тяжелой цепи, идентичную таковой антитела человека, и константную область легкой цепи, идентичную таковой антитела человека, и обеспечения экспрессии вектора путем его введения в клетку животного. Понятие «вектор экспрессии гуманизированного антитела» может относиться к случаю, когда ген, кодирующий тяжелую цепь антитела, и ген, кодирующий легкую цепь антитела, находятся в разных векторах, или к случаю, когда оба гена находятся в одном векторе (тандемный тип). В отношении простоты конструирования вектора экспрессии гуманизированного антитела, простоты введения в клетки животных и баланса между уровнями экспрессии H- и L-цепей антитела в клетках животных более предпочтительным является тандемный тип вектора экспрессии гуманизированного антитела. Примеры вектора экспрессии гуманизированного антитела тандемного типа включают pKANTEX93, pEE18 и т.п. Способы получения гуманизированных антител на основе обычных технологий рекомбинантных ДНК и генной трансфекции хорошо известны в данной области. Антитела можно гуманизировать с использованием различных технологий, известных в данной области, включая, например, прививку CDR, венирование или переукладку либо перетасовку цепей. Известна также общая технология рекомбинантных ДНК для получения таких антител.

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

- легкую цепь, где переменный домен содержит каждую из трех областей CDR, как показано в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, SEQ ID NO: 2 для CDR-L2 и SEQ ID NO: 3 для CDR-L3; а также

- тяжелую цепь, в которой вариабельный домен содержит каждую из трех областей CDR, как показано в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, SEQ ID NO: 5 для CDR-H2 и SEQ ID NO: 6 для CDR-H3

Настоящее изобретение также относится к антителу против HERV-W ENV, описанному выше, для терапевтического применения или для применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с одним воплощением настоящее изобретение относится к антителу, направленному против HERV-W ENV и индуцирующему в нейронах перемещение NMDA-рецептора, содержащего GluN2B, в синапсы для терапевтического применения в качестве лекарственного средства.

В соответствии с одним воплощением настоящее изобретение относится к антителу, направленному против HERV-W ENV, для терапевтического применения в качестве лекарственного средства, где указанное антитело связывается с конформационным эпитопом HERV-W ENV, образуемым двумя отстоящими линейными последовательностями, представленными SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

В соответствии с одним воплощением настоящее изобретение относится к антителу, направленному против HERV-W ENV, для терапевтического применения в качестве лекарственного средства, где указанное антитело содержит каждую из определяющих комплементарность областей (CDR), представленных 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.

Эти три воплощения можно комбинировать друг с другом.

Фармацевтическая композиция

Еще один объект изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело, направленное против HERV-W ENV, как описано выше, или его фрагмент или производное, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В частности, фармацевтическая композиция содержит эффективное количество указанного антитела.

Настоящее изобретение также относится к такой фармацевтической композиции для применения при лечении группы пациентов с психотическим заболеванием, имеющих высокий уровень цитокина в образце жидкости организма, как описано выше.

Любое терапевтическое средство по изобретению, как описано выше, может быть объединено с фармацевтически приемлемыми эксципиентами и, необязательно, матрицами с замедленным высвобождением, такими как биоразлагаемые полимеры, с получением терапевтических композиций.

Термины «фармацевтически» или «фармацевтически приемлемый» означают молекулы и составы, которые не вызывают побочных, аллергических или других неблагоприятных реакций при введении млекопитающему, особенно человеку, соответствующим образом. Фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент относится к нетоксичному твердому, мягкому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу или вспомогательному веществу для приготовления лекарственной формы любого типа.

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

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть приготовлены в форме для местного, перорального, интраназального, внутриглазного, внутривенного, интратекального (непосредственно в спинномозговую жидкость), внутримышечного или подкожного введения и т.п.

Предпочтительно фармацевтические композиции содержат носители, которые фармацевтически приемлемы для состава, подлежащего инъекции. Это могут быть, в частности, изотонические, стерильные солевые растворы (мононатрия или динатрия фосфат, хлорид натрия, калия, кальция или магния и т.п. или смеси таких солей) или сухие, особенно лиофилизированные композиции, которые при добавлении к ним, в зависимости от ситуации, стерилизованной воды или физиологического раствора, образуют растворы для инъекций.

Дозы, используемые для введения, могут быть адаптированы в зависимости от различных параметров и, в частности, в зависимости от используемого способа введения, соответствующей патологии или, альтернативно, желаемой продолжительности лечения.

Для приготовления фармацевтических композиций эффективное количество антитела, направленного против HERV-W ENV, или его фрагмента или производного можно растворить или диспергировать в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

Фармацевтические формы, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии, составы, содержащие кунжутное масло, арахисовое масло или водный раствор пропиленгликоля, и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко набирать 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 фармакологически приемлемых солей можно приготовить в воде, соответствующим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также можно приготовить в глицерине и в маслах. При обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

После смешивания растворы будут вводиться способом, совместимым с дозированной формой, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводят в различных лекарственных формах, таких как растворы для инъекций, описанные выше, но также можно использовать капсулы с высвобождением лекарственного средства и т.п.

Предпочтительно антитело, направленное против HERV-W ENV по изобретению, можно ввести в состав буфера, в котором его солюбилизируют, сохраняют и вводят пациентам. Предпочтительно указанный буфер содержит 20 мМ гистидина, 5% сахарозы и 0,01% полисорбата 20.

Например, для парентерального введения в водном растворе раствор может быть соответствующим образом забуферен, а жидкий разбавитель сначала следует сделать изотоничным с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Такие конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В этой связи стерильные водные среды, которые можно использовать, известны специалистам в данной области техники в свете настоящего изобретения. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавить к 1000 мл жидкости для гиподермоклиза, либо ввести в предполагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15-е издание, стр. 1035-1038 и 1570-1580). Некоторое изменение дозировки обязательно будет иметь место в зависимости от состояния проходящего лечение пациента. Лицо, ответственное за введение, в любом случае определяет подходящую дозу для конкретного пациента.

В соответствии с предпочтительными воплощениями изобретения антитело по изобретению приготовлено для внутривенного или интратекального введения.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

Во всех подписях и фигурах «Конт. означает «Контроль».

ФИГУРА 1: Сыворотки пациентов с диагнозом шизофрении или биполярного расстройства с детектируемым белком HERV-W ENV (ENV) (положительная антигенемия) индуцируют нейротрансмиттерные нарушения (специфическое снижение NMDAR и синаптическую дисперсию) с одинаковыми характеристиками, подтвержденными с использованием рекомбинантного ENV, которые можно обратить или предотвратить с помощью антитела против HERV-W ENV

(А и В) Повышение уровня интерлейкина-1 β в ENV-положительных (пол., n = 6) образцах сыворотки от психотических пациентов (отр., n = 5). *P = 0,043, t-критерий Стьюдента. (С) Репрезентативное изображение культивируемой сети и трансфицированного нейрона после 15-минутной инкубации образца сыворотки. Масштабная линейка, верх/низ = 30/10 мкм. (D) ENV-пол. образцы сыворотки специфически уменьшают площадь кластера GluN1 (врезка). GluA1-SEP (n = 57/43 нейронов отр./пол.), GluN1-SEP (n = 56/61), Дофамин 1-CFP (n = 54/61) и GABA γ 2-SEP (n = 59/68). Масштабная линейка = 1 мкм и врезка 0,3 мкм. *P = 0,048, t-критерий Стьюдента. (Е и F) NMDAR-опосредованные следы Ca²⁺, зарегистрированные в шипиках, точки представляют обнаруженные перемещения после 5-минутного воздействия рекомбинантного белка оболочки (ENV) или носителя (Конт.). D-AP5 (50 мкМ) блокирует все перемещения. Масштабная линейка = 1 мкм. (F) Соотношение Ca²⁺ - перемещений для холостого образца (n = 47/5 шипиков/нейронов), Конт. (n = 92/7), ENV: 0,5 мкг/мл (n = 87/6), 1,0 мкг/мл (n = 114/9) и 10 мкг/мл (n = 18/1). (G) Репрезентативные следы NMDA и средняя амплитуда пика до (перед) и через 5 минут после применения Конт. (n = 4 нейрона) или ENV (1 мкг/мл, n = 6). (H) Репрезентативные траектории комплексов GluN2A- и GluN2B-NMDAR-QD при постсинаптических плотностях (PSD) через 5 минут после воздействия Конт. или ENV (1 мкг/мл). Масштабная линейка = 1 мкм. (I) ENV вызывает специфическое увеличение диффузии GluN2B-содержащих NMDAR-рецепторов с поверхности преимущественно в синаптические области. Данные нормализованы к предварительному воздействию для отдельных нейронов. GluN2A: Extra Syn.: Конт. n = (300/4 траекторий/нейронов) ENV (n = 445/5), Synaptic: Конт. (n = 176/4), ENV (n = 200/5). GluN2B: Extra Syn.: Конт. (n = 819/10), ENV (n = 727/10), Synaptic: Конт. (n = 670/10), ENV (n = 792/10). *P = 0,0319 и ***P < 0,0001, критерии Манна-Уитни. (J) Среднеквадратичные замены (MSD) для синаптических данных в (I). (K) Совместное применение моноклональных антител против HERV-W ENV устраняет эффект ENV, Конт. (n = 407/7), ENV (n = 484/6). Столбцы и точки означают среднее значение $\pm$ SEM.

ФИГУРА 2: Глиальные клетки участвуют в глутаматергических нарушениях, вызванных ENV

(а) Репрезентативное изображение нейронных культур, свободных от глии (желтые) (MAP-2-положительные), и нейронных культур глии (пурпурные) (положительные по GFAP и Iba1). Масштабная линейка = 50 мкм. (b) Синаптическая диффузия GluN2B в культурах без глии после 5-минутного воздействия носителя (Конт. n = 295/7 траекторий/нейронов) или ENV (1 мкг/мл, n = 377/6). (справа) Среднеквадратичные смещения (MSD). (c) Синаптическая диффузия GluN2B после воздействия Конт. или ENV в присутствии нейтрализующего антитела TLR-4. Конт. (n = 163/5), ENV (1 мкг/мл, n = 276/6), (справа) MSD. Масштабная линейка = 1 мкм. (d) Детекция высвобождения цитокинов в культуральную среду через 5 минут после воздействия ENV (10 мкг/мл), (n = 5 культур) * P = 0,037, 0,026, 0,026, ** P = 0,009, 0,009, парные t-критерии Стьюдента. (e,f) Синаптическая диффузия GluN2B в присутствии ENV (1 мкг/мл) плюс α TNF- α , α IL-6 (1 мкг/мл) блокирующие антитела или антагониста рецептора IL-1 (IL-1ra, 250 нг/мл). Конт. (носитель, n = 579/6), ENV (n = 352/6), ENV + α TNF- α (n = 461/5), ENV + α IL-6 (n = 404/4), ENV + IL-1ra (n = 365/7). ***P < 0,0001 и 0,006, критерий Крускала-Уоллиса с последующим множественным сравнением Данна. (f) MSD для данных из E, включая Конт. + IL-1ra (n = 176/7). (g) Увеличение диффузии GluN2B с поверхности после 5-минутного воздействия IL-1 β в культурах гиппокампа без глии. Конт. (n = 423/7), IL-1 β (1 нг/мл, n = 480/7). ***P < 0,0001, критерий Манна-Уитни. Данные нормализованы к предварительному воздействию для отдельных нейронов.

ФИГУРА 3: Ответ GluN2B на стимуляцию LPS и разнообразную активацию микроглии по сравнению с ENV

(А) Увеличение синаптического коэффициента диффузии GluN2B-NMDAR в смешанных культурах без глии через 5 мин после стимуляции LPS (1 мкг/мл). Смешанные культуры: физиологический раствор (Конт.) n = 340/6 (траектории/нейроны), LPS (0,01 мкг/мл) n = 281/5, LPS (0,1 мкг/мл) n = 329/5, LPS (1 мкг/мл) n = 446/6. Культуры без глии: Конт. n = 547/4, LPS (1 мкг/мл) n = 312/4. Данные нормализованы к исходному состоянию перед добавлением Конт. или LPS для каждого отдельного нейрона $\pm$ SEM. ***P = 0,0004, критерий Крускала-Уоллиса с последующим множественным сравнением Данна. (В) Синаптическая диффузия GluN2B-NMDAR после 24-часовой стимуляции LPS. Конт. n = 990/27, ENV n = 606/32. Данные представляют собой медиану $\pm$ 25-75% интерквартильный размах (IQR), ***P < 0,0001, критерий Манна-Уитни. (С) Репрезентативные изображения Iba1-положительных клеток микроглии через 24 часа

после воздействия LPS (1 мкг/мл) или ENV (1 мкг/мл). Масштабная линейка = 10 мкм. (D) Количественная оценка площади клеток микроглии (мкм^2) в смешанных холостых культурах (Конт.) $n = 1420$ (клетки), ENV $n = 1279$ и LPS $n = 1763$. *** $P < 0,0001$ по критерию Крускала-Уоллиса с последующими множественными сравнениями Данна. (E) (вверху) Графическая иллюстрация морфологии микроглии по отношению к индексу трансформации (ТИ). (внизу) Кумулятивная фракция ТИ в трех условиях со значением ТИ < 3 , определенным как амeboидные клетки. Обратите внимание на изменение процентного содержания амeboидных клеток после стимуляции LPS (56%) по сравнению с Контролем (70%) и ENV (71%).

ФИГУРА 4: Реакция синаптического GluN2B на ENV

(A) Коэффициент диффузии синаптического GluN2B-NMDAR через 5 минут после применения ENV в разных дозах. Представленные данные нормализованы к исходному уровню перед добавлением носителя (Конт.) или белка оболочки (ENV) для каждого отдельного нейрона, среднее значение $\pm$ SEM. Конт. $n = 164/19$ (траектории/нейроны), ENV 0,5 мкг/мл, $n = 90/7$, ENV (1 мкг/мл), $n = 805/13$, ENV (10 мкг/мл), $n = 140/7$. *** $P < 0,0001$ по критерию Крускала-Уоллиса с последующими множественными сравнениями Данна. (B) Медиана коэффициента диффузии траекторий синаптических GluN2B-NMDAR для отдельных нейронов (кружки). Парные данные показаны для исходного уровня (перед) и через 5 минут после добавления носителя (Конт. $n = 16/12$ нейронов/культуры) или ENV (1 мкг/мл, $n = 17/13$). * $P = 0,038$, двусторонний парный t-критерий. (C) Термическая инактивация устраняет эффект ENV. Термически инактивированный носитель (Конт. $n = 563/7$) или ENV ($n = 443/6$). (справа) Среднеквадратичные смещения (MSD) для синаптических данных. (D) Совместное применение тетрадотоксина (TTX, 1 мкМ) и ENV не устраняет эффект ENV (Конт. $n = 181/3$) или ENV ($n = 182/4$). Представленные данные представляют собой коэффициент диффузии, нормализованный к предварительному условию для каждого отдельного нейрона, среднее значение $\pm$ SEM.

ФИГУРА 5: Ответ GluN2B на длительное воздействие ENV и специфические эффекты ENV, нейтрализуемые антителом против HERV-W ENV

(A) Специфическое увеличение подвижности поверхности GluN2B-содержащих NMDAR-рецепторов в ответ на 24-часовое воздействие ENV. GluN2A: Конт. $n = 382/15$ (траектории/нейроны), ENV (0,5 мкг/мл) $n = 147/6$, ENV (1,0 мкг/мл) $n = 277/13$. GluN2B: Конт. $n = 612/22$, ENV (0,5 мкг/мл) $n = 485/19$, ENV (1,0 мкг/мл) $n = 600/18$, антитело против HERV-W ENV (N.Ab) $n = 204/14$. *** $P = 0,0004$, критерий Крускала-Уоллиса с последующими множественными сравнениями Данна. (B) Среднеквадратичные смещения

(MSD) для данных в (A). (C) Экстрасинаптическая диффузия GluN2A- и GluN2B-NMDAR с поверхности после 24-часового воздействия ENV. GluN2A: Конт. $n = 2214/28$ (траектории/нейронные поля) ENV $n = 1670/31$, GluN2B: Конт. $n = 3882/65$, ENV $n = 3872/51$. $**P = 0,0029$, критерий Манна-Уитни. Значения представляют медиану синаптического коэффициента диффузии ± 25 -75% интерквартильный размах (IQR).

ФИГУРА 6: HERV-W ENV (ENV) индуцирует изменения активности глутаматергической сети и синаптического действия

(A) Условия эксперимента. Масштабная линейка = 10 мкм. (B) Увеличение частоты NMDAR-опосредованного перемещения Ca^{2+} после длительного (24 часа) воздействия ENV модулируется совместным воздействием IL-1ra. Конт. ($n = 103/8$ шипиков/нейронов), Конт.+IL-1ra ($n = 110/7$), ENV ($n = 79/10$), ENV+IL-1ra ($n = 111/7$). $**P = 0,0055$ и $***P < 0,0001$, двухфакторный дисперсионный анализ с последующими множественными сравнениями Бонферрони. (C) Детекция перемещений Ca^{2+} (точки) и коррелированное время (заштрихованные области) от 3 шипиков на двух примерах нейронов после длительного воздействия Конт. и ENV. (D) Характеристические коррелограммы средней корреляции перемещений шипиков через 24 часа воздействия Конт. или ENV и (справа) количественные графики. $***P < 0,0001$, критерий Манна-Уитни. (E) Условия эксперимента и репрезентативные изображения совместно трансфицированных нейронов. Масштабная линейка = 300 и 40 мкм. (F) Коррелограммы и количественные графики для Конт. (пустой вектор) и ENV (phCMV-MSRV ENV) трансфицированных клеток, совместно с IL-1ra или без него. Конт. $n = (118/8)$, Конт.+ IL-1ra ($n = 151/8$), ENV ($n = 166/8$), ENV + IL-1ra ($n = 154/8$), $***P < 0,0001$ и $**P = 0,0052$, критерий Манна-Уитни. (G) Поверхностный GluA1-SEP в синаптических областях (Homer 1c). Масштабные линейки = 5 и 1 мкм. (G (внизу) и H) Интенсивность флуоресценции синаптического GluA1 после длительного воздействия ENV, Конт. ($n = 1071/25$, шипики/нейронные поля) и ENV ($n = 728/21$), $***P < 0,001$, критерий Колмогорова-Смирнова. (I) Покадровые снимки в реальном времени на исходном уровне (-5 минут) и после химической индукции LTP (сLTP) и (справа) пример эволюции синаптической флуоресценции GluA1-SEP после индукции сLTP, нормализованной к исходному уровню, для Конт. и ENV. Масштабная линейка = 1 мкм. (J) Соотношение интенсивности GluA1-SEP между пост-сLTP и исходным уровнем (перед) для отдельных шипиков. График «ящик с усами» (процентили 10-90) с Конт. без сLTP ($n = 621/13$), с сLTP ($n = 902/12$), ENV без сLTP ($n = 461/17$), с сLTP ($n = 472/14$). $*P = 0,0233$, $***P < 0,0001$, критерий Манна-Уитни. Данные представляют собой среднее значение $\pm$ SEM, если не указано иное.

ФИГУРА 7: Экспрессия MSRВ-ENV в электропорированных клетках, жизнеспособность клеток и экспрессия GluN2 во фракциях синапсом гиппокампа

(А) Корональные срезы областей СА1 гиппокампа животных с электропорацией GFP в день P7, совместно окрашенных на глутаминсинтетазу (GS) или ионизированную кальций-связывающую молекулу адаптера 1 (Iba1). Масштабная линейка = 10 мкм. (В) Репрезентативные изображения процесса детектирования апоптотических клеток (TUNEL) в областях СА1 гиппокампа электропорированных животных в день P7. Масштабные линейки = 1 и 200 мкм. (С) Количественное определение положительных клеток/мм² в разных участках. Значения представляют собой среднее значение $\pm$ SEM, n = 3 животных/группу. (D) Вестерн-блот-анализ субклеточного фракционирования. Рецепторы NMDA (GluN2A/2B) и белок постсинаптической плотности (PSD-95) обогащены P2- и синапсомной фракциями по сравнению с Н, в то же время наблюдается истощение глии (GFAP). (Е) Репрезентативные хемилюминесцентные следы от синапсом, исследованных на аппарате WESTM для GluN2 (А + В) и PSD-95.

ФИГУРА 8: Влияние вставки в ДНК на увеличение массы тела и поведенческие характеристики

(А) Нормальная прибавка в массе тела у животных с электропорацией по сравнению с наивными животными (n = 17-31 животное/группа). (В) Крысы Env не демонстрируют изменений в тревожном поведении, измеряемом по времени, проведенному в центре открытого поля (n = 16). (С) Отсутствие влияния нагрузки ДНК на реакцию пре-импульсного ингибирования (PPI) (Конт. n = 11, Конт.+ пустой вектор n = 14). (D) Клозапин (12 мг/кг) улучшает ответ PPI у животных Env (n = 12). (Е) ответ PPI у контрольных животных после применения протокола перекрестной связи с Конт. IgG или GluN1-Ab (Конт. IgG n = 12, GluN1 n = 11). Значения представляют собой среднее $\pm$ SEM.

ФИГУРА 9: Селективное встраивание HERV-W ENV (ENV) в клетки гиппокампа индуцирует синаптические изменения NMDA и поведение, связанное с психозом у крыс

(А) Схематическая репрезентация электропорации в постнатальный день (P)1. (В и С) Репрезентативные изображения распределения генов, встроенных в гиппокамп. Масштабная линейка = 1 мм и вставка = 100 мкм. (D) Клетка, экспрессирующая pHCMV-MSRV ENV, из участка СА1. Масштабная линейка = 20 мкм. (Е) Последовательность поведенческих исследований: адаптация (Адапт.)/открытое поле, преимпульсное ингибирование (PPI) и провоцирование антагонистом NMDAR (МК-801). (F) Блот встроенной экспрессии гена (GFP) через 70 дней после электропорации. (G) Снижение отношения GluN2(A+B)/PSD-95 в синапсомах ENV-гиппокампа. *P = 0,012, критерий

Манна-Уитни. Точки соответствуют отдельным животным, а столбцы — средним значениям. (H) Базальная локомоция и адаптация к контексту, измеренная как пройденное расстояние (см) в течение 20 минут. Значения представляют собой среднее $\pm$ SEM. (I) Увеличение МК-801 (0,3 мг/кг), вызывающее гиперлокомоцию у животных ENV. Значения представляют собой среднее значение $\pm$ SEM, *P и **P (черные линии), двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA RM, апостериорный анализ Фишера LSD ($n = 9-11$ крыс / группа). (J) Экспрессия ENV ухудшает реакцию испуга PPI. *P = 0,0180 и **P = 0,0019, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Бонферрони. (справа) Клозапин (12 мг/кг) восстанавливает нарушенный ответ PPI. (K) Дизайн эксперимента, (справа) место внутригиппокампальной инъекции. (L) Эффективность PPI у животных ENV после х-связывания GluN1. *P = 0,0195, **P = 0,0093, однофакторный дисперсионный анализ с поправкой на невзвешенные средние значения с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Точки соответствуют отдельным животным, а линии представляют средние значения.

ФИГУРА 10: Неонатальная экспрессия ENV осуществляет тонкую настройку созревания глутаматергических синапсов и необходима для психотического поведения, которое можно обратить вспять с помощью инъекций *in vivo* нейтрализующего антитела к HERV-W ENV

(A) Субклеточное фракционирование ткани гиппокампа. Обратите внимание на обогащение рецепторов NMDA (представленных GluN2A) и белков постсинаптической плотности (PSD-95) в P2- и синаптосомных (обогащенных синаптическими белками) фракциях по сравнению с исходным гомогенатом, а также на истощение глии (GFAP) там же. (B) Репрезентативные изображения распределения встроенных генов на P7. Масштабная линейка = 1 мм. (C) Экспрессия встроенного гена гиппокампа на уровне ~ P65. (D) Воздействие ENV, как правило, влияет на стабилизацию субъединицы GluN2A/PSD-95 в синапсе (P7, Конт. против ENV, P = 0,06), которая затем остается постоянной. Взаимодействие: $F(1,29) = 8,69$, двухфакторный ANOVA, критерий множественных сравнений Бонферрони, *P = 0,021, ***P = 0,0004. (E) Экспрессия GluN2B/PSD-95 не зависит от ENV в обоих возрастах. Взаимодействие: $F(1,29) = 2,46$, P = 0,13, двусторонний дисперсионный анализ ANOVA, критерий множественных сравнений Бонферрони, ***P < 0,0001, ($n = 8-9$ животных/группу). Столбцы являются средним значением $\pm$ SEM. (F) P7 ENV-животные демонстрируют повышенное взаимодействие GluN2A-IL-1R. Иммунопреципитация (ИП) IL-1R, *P = 0,0462, критерий Стьюдента ($n =$

5-7 животных/группу). (G) Экспрессия GluA2/PSD-95 повышена у взрослых животных, $**P = 0,0098$ t-критерий Стьюдента ($n = 6-9$ животных/группу). (H) Экспрессия PSD-95 одинаковая при сравнении Конт. и ENV для крыс P7 и P65. (I) Протокол лечения в раннем послеродовом периоде (внутрибрюшинные инъекции) на P4, 8 и 12 с нейтрализующим ENV Ab (30 мг/кг). (J) Лечение улучшает ответ PPI у ENV-животных, $*P = 0,037$, однофакторный ANOVA, критерий множественного сравнения Тьюки. Точки соответствуют отдельным животным, а столбцы представляют средние значения.

ФИГУРА 11: Структура функционального белка с последовательностями CDR антитела ENVW2.3 - область VL

(A) Линейная пептидная последовательность представлена с указанием последовательностей CDR (CDR1, CDR2 и CDR3). (B) «Представление жемчужного ожерелья» (Pearl Necklace representation) согласно Pommié C и соавт., 2004. *Journal of Molecular Recognition*, 17, 17-32; IMGT (Международная информационная система ImMunoGeneTics для иммуноглобулинов или антител, Т-клеточных рецепторов, МН, надсемейства иммуноглобулинов IgSF и MhSF).

ФИГУРА 12: Структура функционального белка с последовательностями CDR антитела ENVW2.3 - область VH

(A) Линейная пептидная последовательность представлена с указанием последовательностей CDR (CDR4, CDR5 и CDR6). (B) «Представление жемчужного ожерелья» (Pearl Necklace representation) согласно Pommié C и соавт., 2004. *Journal of Molecular Recognition*, 17, 17-32; IMGT (Международная информационная система ImMunoGeneTics для иммуноглобулинов или антител, Т-клеточных рецепторов, МН, надсемейства иммуноглобулинов IgSF и MhSF).

ФИГУРА 13: Аминокислотная последовательность HERV-W/MSRV-ENV с сайтом фиксации ENVW2.3, подчеркнутая черной сплошной линией (сайт 1) и серой сплошной линией (сайт 2).

Третичная конформация белка MSRV-ENV такова, что последовательности, подчеркнутые черной сплошной линией и серой сплошной линией (сайт 1 и сайт 2), соприкасаются друг с другом. Это создает конформационный эпитоп, распознаваемый антителом ENVW2.3. Последовательность, подчеркнутая пунктирной линией, соответствует аминокислотам, находящимся между сайтами 1 и 2, которые образуют эпитоп ENVW2.3, не распознаваемый антителом.

ФИГУРА 14: Экспрессия HERV-W ENV и воспалительные цитокины в сыворотке определяют подгруппы при шизофрении и биполярном расстройстве

(а) Процент здоровых контрольных субъектов (НС), субъектов, больных шизофренией (SZ) и биполярным расстройством (BP), которые являются положительными (HERV-W_{пол}) или отрицательными (HERV-W_{отр}) в отношении антигенемии HERV-W ENV. Числа в столбцах представляют количество субъектов. ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$, что отражает значимую разницу между случаями НС и SZ или BP, основанную на критериях хи-квадрат. (b) Важность предикторов для стратификации кластеров и обобщения характеристик кластеров, выявленных с помощью двухэтапного кластерного анализа. Кластерный анализ выявил два основных кластера (CL1 и CL2), которые были разделены на основе положительности по HERV-W и сывороточных цитокинов. Субъекты кластера CL2 являются HERV-W_{пол} и демонстрируют повышенные уровни цитокинов в сыворотке, тогда как участники CL1 являются HERV-W_{отр} без заметных изменений в сывороточных цитокинах. (c) Распределение (процент, %) субъектов НС, SZ и BP по CL1 и CL2. Цифры в скобках представляют количество субъектов в каждом кластере. (d) Сывороточные уровни интерлейкина (IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, интерферона (IFN)- γ и фактора некроза опухоли (TNF)- α у субъектов с НС, подгруппы случаев SZ (SZ/CL1 и SZ/CL2) и подгруппы случаев БП (BP/CL1 и BP/CL2). * $p < 0,01$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ на основе апостериорных критериев Тьюки для множественных сравнений после одностороннего дисперсионного анализа ANOVA. Столбцы представляют собой средние значения $\pm$ SEM.

ФИГУРА 15. Отдельные подгруппы больных шизофренией и биполярным расстройством демонстрируют различные клинические характеристики

Кластерный анализ выявил два основных кластера (CL1 и CL2), которые были разделены на основе положительности по HERV-W и цитокинов в сыворотке (см. Фигуру 14). Субъекты CL2 являются HERV-W_{пол} и демонстрируют повышенные уровни цитокинов в сыворотке, тогда как участники CL1 являются HERV-W_{отр} без заметных изменений в сывороточных цитокинах (см. Фигуру 14). (а) Возраст начала заболевания (годы) в подгруппах случаев SZ (SZ/CL1 и SZ/CL2) и подгруппах случаев BP (BP/CL1 и BP/CL2). ** $p < 0,01$, на основе апостериорных критериев Тьюки для множественных сравнений после двустороннего дисперсионного анализа. (b) Оценки по шкале оценки депрессии Монтгомери-Асберга [MADRS] и оценки по шкале оценки мании Янга [YMRS] в подгруппах случаев SZ (SZ/CL1 и SZ/CL2) и подгруппах случаев BP (BP/CL1 и BP/CL2). * $p < 0,05$, на основе апостериорных критериев Тьюки для множественных сравнений после двустороннего дисперсионного анализа ANOVA. (c) Оценки по шкале положительных и отрицательных синдромов [PANSS] (положительные, отрицательные и

общие симптомы) в подгруппах случаев SZ (SZ/CL1 и SZ/CL2) и подгруппах случаев BP (BP/CL1 и BP/CL2). * $p < 0,05$ и *** $p < 0,001$, отражающие значимую разницу между субъектами кластеров SZ и BP независимо от классификации подгрупп, основанной на двухфакторном дисперсионном анализе ANOVA. (d) Ежедневные эквиваленты хлорпромазина [CPZ] в подгруппах случаев SZ (SZ/CL1 и SZ/CL2). * $p < 0,05$, на основе двустороннего t-критерия. Все значения представляют собой средние значения $\pm$ SEM.

Материалы и методы для примеров 1 - 3

Дизайн исследования

Авторы разработали это исследование, чтобы определить, может ли белок оболочки (ENV), полученный из HERV-W, играть роль в известном глутаматергическом, а именно NMDAR, влиянии на развитие нервно-психических заболеваний. Авторы сначала показали, что ионотропная функция рецептора (антагонисты NMDAR связаны с эффектами, подобными психотическим) остается неповрежденной после воздействия ENV и что вместо этого поверхностная диффузия подтипа NMDAR-GluN2B чувствительна к ENV. Рекомбинантный ENV-буфер использовали в качестве контроля, и, кроме того, термоинактивация и нейтрализация с помощью специфического ENV-антитела подтвердили участие HERV-W ENV. В начале экспериментов по отслеживанию отдельных частиц размер выборки, с одной стороны, определяли на основе предыдущих исследований в лаборатории, а с другой стороны, рассчитывали (калькулятор мощности и размера выборки, Statistical Solutions, LLC) с фактором мощности 0,6–0,8 и $\alpha = 0,5$, что в этом случае соответствовало 4–13 клеткам на условие в зависимости от стандартного отклонения выборки. Для экспериментов всех типов использовали не менее 3 независимых культур для каждого условия. Культуры выбирали случайным образом, а экспериментальные условия чередовались на протяжении экспериментов по визуализации в реальном времени, экспериментатор не знал об условиях во время удаления неспецифических траекторий, в то же время все остальные анализы проводили на полностью автоматизированной основе. Иммуоцитохимические исследования показали, что была затронута экспрессия важного синаптического баланса GluN2A/2B NMDAR-субъединицы. Все анализы, включающие иммуногистохимические/иммуоцитохимические исследования, проводились слепым методом. Авторы следили за тем, чтобы ENV не индуцировал токсичность в нейронных сетях, добавляя пропидий йодид и визуализируя тела здоровых клеток после воздействия ENV. Затем авторы измерили глобальную NMDAR-опосредованную активность, а также NMDAR-зависимую долгосрочную синаптическую потенцию (LTP) и наблюдали

увеличение частоты кальция и абляцию индукции cLTP в культурах, обработанных ENV. В химических LTP-экспериментах изменение интенсивности GluA1SEP выше 10 % в одиночных синапсах на исходном уровне считалось нестабильным, и, следовательно, этот шипик был исключен. Для визуализации кальция шипики с более чем 2 выбросами кальция после применения D-APV считались не содержащими NMDAR и исключались. Затем авторы трансфицировали культуры нейронов плазмидой, содержащей HERV-W ENV, и получили аналогичные результаты. В качестве контроля использовали плазмиду с пустым вектором. Затем авторы задали вопрос, может ли специфическая экспрессия ENV влиять на поведение животного. Для этого авторы экспрессировали ENV в гиппокампе крысят с 0-го постнатального дня и изучали его влияние на серию поведенческих исследований. Авторы контролировали клеточную токсичность, оценивая окрашенные TUNEL клетки и прибавку в массе тела животных, а наличие и степень экспрессии ENV подтверждали с помощью иммуногистохимии и вестерн-блоттинга. У контрольных животных использовали экспрессию GFP и дополнительно пустой вектор. Для поведенческих исследований заранее определенный минимальный размер выборки из 12 животных был основан на предыдущих исследованиях. В этих экспериментах использовали размер выборки 13-18 животных в PPI, что соответствовало фактору мощности 0,6-0,75 и $\alpha = 0,5$, а в экспериментах x-link и МК-801 размер выборки 11 животных соответствовал фактору мощности 0,55 и $<0,8$ соответственно. Крысят из одного помета случайным образом распределяли по разным экспериментальным группам, и группы псевдорандомизировали в каждый день поведенческого тестирования. Как было решено заранее, в качестве критериев исключения использовали потенциацию PPI в ответ на импульсы и в провокационном тесте МК-801, а также стереотипное поведение. Во время исследований на животных экспериментатор был осведомлен о состоянии животного, поскольку все анализы в конце эксперимента, после сбора полного набора данных, проводились на полностью автоматизированной основе. Поскольку авторы наблюдали дефицит в нескольких поведенческих тестах, они затем исследовали экспрессию NMDAR в гиппокампе животного, чтобы связать данные *in vitro* с возможной основной причиной этих наблюдений. Исследования экспрессии белка проводили с 9 животными для каждого условия и повторяли 2-3 раза. Специфически нейтрализуя ENV во время развития, авторы наблюдали явное улучшение поведенческой реакции. Данные показали, что экспрессия HERV-W ENV в гиппокампе вызывает поведенческие дефициты и модулирует созревание синаптических NMDAR во время развития.

Экспрессия ENV в сыворотке крови 7 пациентов с нервно-психическими расстройствами была обнаружена с помощью ELISA. Образцы сыворотки от 6 человек с отсутствием известных заболеваний головного мозга использовались в качестве контроля, а размеры выборки основывались на доступности образцов. В пилотном эксперименте авторы стимулировали нейронные сети, трансфицированные плазмидами, содержащими основные рецепторы нейротрансмиттеров (AMPA, NMDA, дофамин и GABA), образцами сыворотки и наблюдали, что ENV, содержащийся в сыворотке, специфически индуцирует изменения NMDAR.

Наборы для ELISA

Уровни цитокинов исследовали с использованием набора Milliplex Map Kit (RECYTMAG-65K, Millipore). Культуральную среду из 3 различных культур, собранных через 5 минут после внесения носителя (контроль) или ENV (10 мкг/мл), обрабатывали в соответствии с рекомендациями производителя и получали среднюю интенсивность флуоресценции с использованием программного обеспечения Luminex xPONENT на считывающем устройстве BioplexTM MAGPIX (BioRad, Hercules, США). Данные нормализованы к контролю в каждом эксперименте.

Белок оболочки

Рекомбинантный ENV (полноразмерный белок оболочки MSRV, 548 аминокислотных остатков; ENV pV14; номер GenBank AF331500) был произведен компанией PX'Therapeutics (Гренобль, Франция) в соответствии со спецификациями контроля качества (GeNeuro, Женева, Швейцария). Удаление эндотоксина проводили путем очистки серий с использованием Q Acrodisc с последующей фильтрацией на 0,22 мкм фильтре Stericup (Merck, Дармштадт, Германия). Уровни эндотоксина для использованных серий ENV находились в пределах 13,6-92,3 EU/мл, как было измерено с помощью теста с использованием лизата амёбоцитов мечехвоста. Влияние эндотоксина на результаты исключали, проводя наблюдения после термоинактивации при 100°C в течение 30 мин.

Эксперименты по диффузии поверхностных рецепторов

Нейроны трансфицировали постсинаптическим маркером Homer 1c-DsRed на 7 день *in vitro*. Проводимое с высоким разрешением отслеживание NMDAR отдельных молекул было достигнуто после 10-минутной инкубации при 37 ° C с антителами против внеклеточных эпитопов субъединиц GluN2A или GluN2B (Alomone Labs, Иерусалим, Израиль, таблица S3) на 11-14 день *in vitro*. После 10-минутной инкубации с использованием квантовых точек (QD) 655 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific,

Массачусетс, США) в среде с 1% BSA (Sigma-Aldrich, Миссури, США) выбранные области интереса (ROI) (с Homer-1с экспрессирующими нейронами) были визуализированы в течение 500 последовательных кадров при времени сбора данных 50 мс на эпифлуоресцентном микроскопе Nikon eclipse Ti с использованием камеры EMCCD (Evolve, Photometric, Туксон, USA). Сбор данных проводили с помощью программного обеспечения MetaMorph (v.7.7.11.0, Molecular Devices, Саннивейл, США). Мгновенный коэффициент диффузии (D) рассчитывали для каждой траектории на основании линейной аппроксимации первых четырех точек среднеквадратичного смещения (MSD) в зависимости от функции времени с использованием зависимости $MSD(t) = \langle r^2 \rangle (t) = 4Dt$. Для детектирования распределения одиночных комплексов QD были получены стеки кадров, и после бинаризации синаптического сигнала комплексы автоматически располагались в синаптических (Homer-1с положительная область, включая окружающие 2 пикселя) и экстраинаптических компартментах. Были рассчитаны проценты синаптических расположений на стек по отношению к общему количеству, и две самые высокие дельты (до-после) были исключены как выбросы из каждой группы. Данные проецировались на единое фоновое изображение, обеспечивающее распределение комплексов рецептор/ QD и их траекторий с высоким разрешением. Весь анализ отдельных частиц был выполнен с использованием плагина Palmtracerv1.0 в программном обеспечении MetaMorph (Molecular Devices). Влияние ENV (GeNeuro) или LPS (Sigma-Aldrich) по сравнению с соответствующим носителем (контроль) на диффузию рецепторов поверхности оценивали с использованием 2 подходов: i) после 5-минутного нанесения в ванны в камере визуализации после первоначального сбора информации исходного уровня или, ii) через 24 часа после нанесения белка на культуральную среду в чашке. Рекомбинантный IL-1 β (R&D Systems, Миннесота, США) оценивали только после 5-минутного нанесения. Вовлечение TLR-4 изучали путем блокирования рецептора путем предварительной инкубации в течение 30 минут с нейтрализующим антителом против TLR-4 (20 мкг/мл, Affymetrix, Вена, Австрия) при 37°C перед началом эксперимента QD. Специфичность нейтрализующего антитела TLR-4 была подтверждена основным окрашиванием TLR4 на Iba-1-положительных клетках микроглии (Фиг. S2A) и уменьшением окрашивания после трансфекции shTLR-4 (плазмида любезно предоставлена доктором Кюри, Фиг. S2B). Для подтверждения специфичности результатов по ENV, с одной стороны, была проведена термическая инактивация белка (см. выше), а с другой стороны, предварительная инкубация рекомбинантного белка ENV с нейтрализующим ENV антителом, GN_ENV_01/03 (Geneuro), в нормальной лошадиной

сыворотке при молекулярно-массовом соотношении (1:2); ее проводили в стеклянных пробирках в течение 45 мин при комнатной температуре перед нанесением. Для выделения постсинаптического ответа в камеру перед регистрацией вводили тетрадоксин (1 мкМ, TTX, Tocris, Бристоль, Великобритания), а для экспериментов по блокированию цитокинов перед сеансами регистрации в камеру вводили IL-1ra (250 нг/мл, R&D Systems) или нейтрализующие антитела IL-6 и TNF- α (1 мкг/мл, R&D Systems). Участие киназ семейства Src оценивали после 15-минутной инкубации с 1 мкМ PP2 (Calbiochem, Merck).

Культуры клеток и трансфекция

Смешанные культуры нейронов гиппокампа и клеток глии получали от крыс E18 Sprague-Dawley. Кратко, клетки высевали с плотностью 300-350×100 клеток на чашку на покровные стекла, покрытые полилизинном, и выдерживали в нейробазальной среде Gibco (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США), содержащей 3% лошадиной сыворотки, в течение приблизительно 4 дней *in vitro* (div), после чего среду заменяли на нейробазальную среду без сыворотки. Культуры гиппокампа типа Banker, не содержащие глии, готовили в два этапа. Вкратце, первые питающие культуры глии получали из гиппокампа в покрытых полилизинном чашках, затем, через две недели, нейроны гиппокампа (из того же типа препарата, что и для клеток глии) культивировали на покрытых полилизинном покровных стеклах, которые подвешивали над глиальным слоем. Клетки хранили при 37°C в 5% CO₂ в течение максимум 22 дней *in vitro*. Клетки эмбриональной почки человека (НЕК) 293 высевали на покровные стекла в модифицированной Дульбекко среде Игла (Thermo Fisher Scientific) с 10% фетальной телячьей сывороткой и использовали через сутки.

Клетки трансфицировали либо с использованием Effectene (Qiagen, Хилден, Germany) в соответствии с рекомендациями производителя, либо путем трансфекции фосфатом кальция. Плазмида, кодирующая белок HERV-W ENV, состояла из гена сравнения MSRV-env, встроенного в вектор pHCMV, который обеспечивал экспрессию в трансфицированных клетках человека: pHCMV-MSRV env от GeNeuro, Швейцария. Встроенная последовательность синтетической нуклеиновой кислоты «env» кодирует белок оболочки HERV-W, как описано в базах данных (Genbank Ref. AF 331500).

Белок HERV-W ENV

Рекомбинантный ENV (полноразмерный белок оболочки MSRV из 548 аминокислот; ENV pV14; инвентарный номер GenBank AF331500) был произведен компанией PX'Therapeutics (Гренобль, Франция) в соответствии со спецификациями

контроля качества GeNeuro (Женева, Швейцария). Удаление эндотоксина проводили путем очистки серий с использованием Mustang Q Acrodisc с последующей фильтрацией на 0,22 мкм фильтре Stericup (Merck, Дармштадт, Германия). Уровни эндотоксина для использованных серий ENV находились в пределах 13,6-92,3 EU/мл, что было измерено с помощью теста при использовании лизата амёбоцитов мечехвоста. Влияние эндотоксина на результаты было исключено путем проведения наблюдений после термоинактивации при 100°C в течение 30 минут, как описано ранее (18).

Иммуноцитохимия

Перед инкубацией с сывороткой человека нейроны (10 дней *in vitro*) трансфицировали либо субъединицами, содержащими рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA)-A1; рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDA)-N1; рецептор гамма-аминомасляной кислоты (GABA)- γ 2, слитые с суперэклиптическим pHluorin (SEP), либо субъединицами, содержащими рецептор дофамина (D)-1, слитый с голубым флуоресцентным белком (CFP). Образцы сыворотки медленно размораживали и после инкубации с ENV-положительными или ENV-отрицательными образцами сыворотки при 20% в течение 15 минут при 37°C проводили в реальном времени иммуноокрашивание поверхностных рецепторов с антителом против GFP в течение 10 минут при 4°C (термоинактивация факторов комплемента в образцах сыворотки рассматривалась, но не применялась из-за известной термической чувствительности белка ENV). После окрашивания в реальном времени следовала 15-минутная фиксация в 4% параформальдегиде (PFA). Обычно за фиксацией следовали гашение в 50 mM NH₄Cl, блокирование и инкубация с вторыми антителами, связанными с флуорофорами Alexa, в течение 1 часа в 1% альбумине бычьей сыворотки (BSA) (Sigma-Aldrich, Миссури, США) при комнатной температуре (RT). Для окрашивания фиксированных клеток и тканей проводили инкубацию в течение ночи с первыми антителами при 4°C после начальной стадии блокады и пермеабилзации в 1% BSA (Sigma-Aldrich) и 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) в течение 30 мин. Клетки помещали в Mowiol (Calbiochem (Merck)) или Vectashield® + DAPI (Vector Laboratories, Бурлингем, Калифорния). Поверхностное или внутриклеточное окрашивание ENV в НЕК-клетках, трансфицированных усиленным цитозолем зеленым флуоресцентным белком (EGFP) и MSRV-ENV получили через 48 часов с антителом против ENV (GN-mAb 01; GeNeuro, Швейцария). Для исследования активации микроглии клетки фиксировали и окрашивали ионизированной кальций-связывающей адапторной молекулой 1 (Iba1) через 5 минут после нанесения LPS (серотип O26:B6, Sigma-Aldrich) (1 мкг/мл), ENV (PXTherapeutics) (1

мкг/мл) или носителя (контроль). Снимки делали либо с помощью видеоконфокальной системы с вращающимся диском (Leica DMI6000B, Wetzlar, Germany) с камерой CoolSNAP HQ2 (Photometrics, Tucson, USA), либо с помощью Nanozoomer (Hamamatsu, Япония). Площадь кластера определяли с использованием подхода с фиксированным порогом на основе интегрированных уровней флуоресценции в ImageJ. Периметр (мкм) и площадь (мкм²) микроглии определили для всех микроглий, присутствующих на целых покровных стеклах, и рассчитали индекс трансформации (TI) (периметр клетки) $2/4\pi$ (площадь клетки) на основе предыдущих публикаций (27).

Визуализация кальция

Нейроны, трансфицированные GCaMP3 или GCaMP6 на 10 день *in vitro*, переносили в раствор Тироде, содержащий (в mM): 110 NaCl, 5 KCl, 25 HEPES, 15 D-глюкозы, 2 CaCl₂ и 2 MgCl₂. Для выделения NMDAR-зависимых перемещений нейроны затем переносили в раствор Тироде без Mg²⁺ с 5 мкМ нифедипинаа (Tocris) и 5 мкМ бикукуллина (Tocris) за 15 минут до визуализации. Покадровые снимки были получены с помощью программного обеспечения MetaMorph (Molecular Devices) при частоте 20 Гц на эпифлуоресцентном микроскопе Nikon eclipse Ti с камерой EMCCD (Evolve, Photometric). Для оценки немедленных эффектов были последовательно три раза записаны видеоролики (3000 кадров): до (исходный уровень), после (5 минут после применения в ванне с PBS (холостой образец)), носитель (контроль) или ENV и APV (5 минут после применения в ванне с 50 мкМ D-(-)-2-амино-5-фосфонопентановой кислоты (APV, Tocris)). Для продолжительных эффектов были записаны два видеоролика с ускоренной съемкой. Первый, через 24 часа после добавления носителя (контроль), ENV (1 мкг/мл), носителя + IL-га (250 нг/мл) или ENV + IL-га или через 4 дня после трансфекции геном ENV или пустым вектором, а второй - через 5 мин после применения ванны с APV. Видеоролики с ускоренной съемкой были объединены и соотнесены в ImageJ (NIH) с помощью плагина PoorMan3DReg (Майкл Либлинг). Флуоресценцию перемещений кальция в зависимости от времени измеряли в пределах отдельных областей интереса (шипиков), вручную на усмотрение экспериментатора (ImageJ, NIH). Все пиксели в каждой области интереса усредняли, чтобы получить единую кинетику, связанную с областью интереса. Среднюю нормализованную флуоресценцию ($\Delta F/F$) рассчитывали путем вычитания каждого значения из среднего значения за предыдущие 5 секунд, меньшего, чем P50 (μ), и деления результата на μ . Положительные кальциевые перемещения были идентифицированы в соответствии с двухэтапной процедурой: первоначально кривые $\Delta F/F$ были сглажены путем свертки необработанного сигнала с ядром в квадрате 10 с. Используя специально

написанные процедуры Matlab, истинно положительные перемещения NMDA (минимум 1 секунда между перемещениями) определялись автоматически, где порог был установлен на уровне $5 * SD$ среднего следа APV. Парную взаимную корреляцию переходов между шипиками на одном и том же нейроне вычисляли с использованием временного окна 0,5 секунды. Авторы скорректировали значения корреляции, вычитая среднюю корреляцию, полученную путем перетасовки времени между перемещениями для отдельных шипиков (100 повторов).

Химически индуцированная потенция (cLTP)

Живые нейроны гиппокампа, совместно трансфицированные GluA1-SEP и Homer 1c-DsRed на 10 день *in vitro*, инкубировали (12 дней *in vitro*) в течение ночи с ENV (1 мкл/мл) или без него (контроль) при 37°C. Химически индуцированную долговременную потенцию (cLTP) вызывали совместным внесением в ванну 200 мкМ глицина (Tocris) и 5 мкМ пикротоксина (Tocris) в течение 4 минут, как описано ранее (24). cLTP всегда применяли после периода (2 x 5 мин) получения данных исходного уровня, и после индукции среду осторожно заменяли свежей уравновешенной и нагретой средой. Затем сигнал флуоресценции GluA1-SEP регистрировали каждые 5 мин в течение следующих 30 мин. Синапсы были определены с использованием синаптического сигнала Homer 1c, а интенсивность GluA1-SEP (ImageJ, NIH) отслеживали с течением времени в этих синаптических областях и затем нормализовали к исходному уровню, исключительно если синапсы демонстрировали стабильный исходный уровень (вариация менее 10% между -10 и -5 мин). Все снимки были получены на видеоконфокальной системе с вращающимся диском (Leica, DMI6000B, Wetzlar, Germany) с камерой CoolSNAP HQ2 (Photometrics, Tucson, USA).

Животные

Беременных крыс (Sprague Dawley) закупали в компании Janvier (Франция) и в день P 0-1 крысят-самцов из одного помета случайным образом распределяли в разные группы: контроль, контроль+ или ENV. Крыс содержали при постоянной температуре окружающей среды ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) со свободным доступом к пище и воде. Были приложены все усилия, чтобы свести к минимуму количество используемых животных и их страдания. Работу с животными проводили в соответствии с руководящими принципами Европейского сообщества (Директива 2010/63/ЕС), регулирующими исследования на животных, и они были одобрены местным комитетом по этике Бордо (APAFIS № 3420-2015112610591204). Постнатальную электропорацию проводили у новорожденных крысят между P 0-1, как описано ранее. Кратко, детенышей анестезировали гипотермией и

вводили им конструируемые дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), кодирующие цитозольный EGFP, для идентификации трансфицированных клеток (контрольная группа) в сочетании с пустым вектором (контрольная + -группа) или с pHCMV-MSRV ENV (клон pV14, AF 331500) (ENV-группа). Приблизительно 2 мкг ДНК в 8 мкл PBS и 0,1 мкл Fast Green вводили в боковые желудочки с последующей электропорацией пятью электрическими импульсами (150 В, длительность 50 мс, интервал между импульсами 1 с), создаваемыми генератором импульсов (BTX, Harvard apparatus, ECM830, Сан-Диего, Калифорния). Детенышей реанимировали на термоодеяле при 37°C и быстро возвращали к матери.

Поведенческие реакции

Эксперименты проводились во время светового цикла (14.00-20.00) тем же экспериментатором, который ухаживал за животными на протяжении всей их жизни. Массу тела контролировали каждую неделю, и в день Р 21 крысят отнимали от кормящих самок и содержали по 2-5 крыс из одного помета и с тем же воздействием/в той же клетке. Было использовано пять разных групп исследования: i) животные первой группы, контроль (n = 13), ENV (n = 13), были подвергнуты серии поведенческих тестов в следующем порядке: (1) в Р35-37, двигательная активность и тревожность, (2) привыкание/адаптация к открытому полю и (3) в Р56-58 тест предимпульсного ингибирования (PPI) и через 2 дня после этого (4) социальное узнавание и взаимодействие; ii) животные второй исследуемой группы, контроль (n = 30), ENV (n = 30), либо подвергались воздействию клозапина/носителя до PPI, либо подвергались контрольному заражению МК-801 на следующий день после PPI; iii) третья исследуемая группа, контроль (n = 11), контроль+ (n = 14), была протестирована на PPI и iv) четвертая исследуемая группа, ENV (n = 22), подвергалась воздействию согласно протоколу перекрестных связей (см. ниже стереотаксическую инъекцию) за день до PPI. v) Животным последней контрольной группы (n = 13), ENV (n = 24) вводили нейтрализующее-Ab ENV в раннем постнатальном периоде. Все животные были «наивные» в отношении оборудования, когда их впервые представили для испытаний, и их акклиматизировали в помещении не менее чем за 1 час до начала исследования. Группы были псевдорандомизированы в каждый день поведенческого тестирования. Во время испытаний в открытом поле и PPI экспериментатор был осведомлен о состоянии животного, хотя сбор поведенческих данных проводился с использованием полностью управляемой компьютером установки и беспристрастным способом. Напротив,

исследователь не был в курсе воздействия во время анализа оценки в тесте социального узнавания и взаимодействия. См. экспериментальную схему на Фиг. 4С.

Открытое поле

Двигательную активность измеряли на арене открытого поля (длина 54 см, ширина 54 см, высота 40 см) при освещении примерно 5 люкс. Двигательную активность, вызванную новой обстановкой, оценивали путем видеослежения за крысой, которой позволяли свободно исследовать пустую арену в течение 2х10 минут в день 1 из 3 последовательных дней тестирования. По записям в 1-й день тревожность оценивали как время, проведенное в центральной зоне, составляющей 50% арены, в течение первых 10 мин. Затем оценивали привыкание/адаптацию к обстановке по снижению двигательной активности на 2-3-й день. Для исследований МК-801 контрольным ($n = 13$) и ENV ($n = 12$) крысам вводили внутривентральную (в/б) инъекцию физиологического раствора и оставляли исследовать арену в течение одного часа. Затем вводили (в/б) инъекцию МК-801 (0,5 мг/кг, Tocris) и наблюдали за животными еще в течение двух часов. Одно животное было исключено из-за стереотипного поведения после инъекции. Общее пройденное расстояние определили с помощью программного обеспечения IDtracker (43) и проанализировали с помощью автоматизированных написанных в компании программ MATLAB.

Предимпульсное ингибирование (PPI)

PPI выполняли с использованием стартл-камеры (startle chamber) Panlab (Harvard, San Diego Instruments). Каждый сеанс PPI длился примерно 31 мин и начинался с 5-минутного периода акклиматизации при постоянном фоновом шуме. Сеанс состоял из 8 различных типов испытаний: отсутствие импульса, стартл-импульс (startle pulse) (120 децибел (дБ) на частоте 8 кГц, 40 мс), которому предшествовали или не предшествовали предимпульсы деревовидного типа на +4, +8 и +12 дБ выше фонового шума 74 дБ (20 мс, интервал 100 мс), а также только предимпульсы. Каждый сеанс начинался с 10 стартл-импульсов (ITI 70 с), за которыми следовал сбалансированный псевдослучайный порядок из 8 испытаний $\times$ 6 и заканчивался заключительным блоком из 10 стартл-импульсов. Исходные данные из разных групп были первоначально объединены, так как влияние Envgen на общий PPI, измеренный в трех предварительных импульсах, было одинаковым: 1) двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, групповой фактор; $F(1,72) = 11,23$, $**P = 0,0013$, $n = 13$ и, 2) двусторонний ANOVA, групповой фактор; $F(1,102) = 9,597$, $**P = 0,0025$, $n = 18$. Потенциация в ответ на предимпульсы наблюдалось в обеих группах животных, и эти животные были исключены из конечного набора

данных. Предимпульсное ингибирование выражается в % PPI и рассчитывается как $(100 * ((S-PP)/S))$, где S = средний ответ в испытаниях только со стартл-импульсами, а PP = средний ответ в испытаниях с предимпульсами + стартл-импульсами. Авторы подтвердили, что нагрузка ДНК была тривиальной для поведенческого результата (исследуемая группа iii), сравнив животных GFP с животными GFP, которым сделали электропорацию пустого вектора (Фиг. S6C). В исследуемой группе ii) клозапин (Abcam, Кембридж, Великобритания) (12 мг/кг) растворяли в 0,1 н. HCl и забуферивали NaOH до pH 5,6, после чего делали однократную (в/б) инъекцию (1 мл/кг, клозапин или носитель) контрольным (n = 12) и ENV (n = 12) животным за 20 минут до оценки PPI (рис. S6D). Обработка носителем не влияла на ответы PPI (данные не показаны). За сутки до теста PPI в исследуемой группе iv) проводили стереотаксические инъекции. Кратко, крыс (P55-57) из группы ENV анестезировали изофлураном и помещали в стереотаксическую рамку. 0,8 мг (2 мкл) поликлонального козьего антикроличьего IgG (Novex, Thermo Fisher) (ENV + Конт.IgG) (n = 13) или антикроличьего GluN1 (Alomone Labs) (перекрестная связь ENV + GluN1) (n = 11), разведенного в 0,1% триптановом синем (Sigma-Aldrich) (1:5), стереотаксически вводили в каждый гиппокамп (координаты относительно брегмы, AP: -4,5 мм, ML: $\pm 3,2$ мм, DV: -2,0 мм). На основании перекрестной согласованности, повышенной реакции на усиленный предимпульс во всех группах и сильной реакции на предимпульс +8 дБ, в основном показаны данные PPI, получаемые от этого предимпульса. Полный набор данных можно увидеть на Фиг. S6E. Эксперименты из исследуемой группы ii-iv проводили параллельно. Раннее постнатальное воздействие проводили однократной в/б инъекцией ENV-нейтрализующего Ab (GN_mAb_ENV_03, 30 мг/кг, GeNeuro) в PN4, 8 и 12, затем животных оставляли в их домашних клетках до дня проведения теста PPI на ~P58.

Социальное узнавание и взаимодействие

Этот протокол был взят из (43) и адаптирован. За день до испытаний 3 крысы (1 исследуемая крыса (контрольная или ENV) и 2 целевые крысы («наивные»)) одинаковой массы тела ($\pm 5\%$) из разных пометов были назначены для совместного исследования. Затем целевых крыс приучали к экспериментальной клетке (жилой клетке) в помещении для эксперимента в течение 1 часа. В день эксперимента исследуемую крысу приучали к клетке для эксперимента в течение 1 часа. После этого без какого-либо обучения начиналось испытание, первую целевую крысу помещали в ту же клетку (3х1 мин, ITI 3 мин) и регистрировали социальное узнавание. Затем во время последнего сеанса взаимодействия первую целевую крысу удаляли, а вторую целевую крысу помещали в

экспериментальную клетку вместе с исследуемой крысой, и регистрировали социальное взаимодействие в течение 10 минут. В последнем сеансе контрольные крысы исследования показали повышенное взаимодействие в течение первой минуты, что означает, что крысы снова заинтересовались незнакомой крысой (вторая целевая крыса). Затем для определения социального взаимодействия измерили в баллах последний сеанс целиком (10 минут). Исследуемые и целевые крысы не использовались в этой парадигме более одного раза. Видео оценивали слепым методом в зависимости от времени, когда исследуемая крыса активно участвовала в социальном поведении (обнюхивание, груминг, тесное следование (close following) и проползание над/под). Агрессивного поведения во время сеансов замечено не было.

Приготовление тканей

Мозг извлекали между 2-14 днями после PPI и либо весь мозг быстро замораживали в изопентане (Sigma-Aldrich) и помещали в жидкий азот, либо его сначала переносили в ледяную искусственную мозговую жидкость для рассечения областей гиппокампа, а затем замораживали в жидком азоте. Замороженную ткань гиппокампа позже обрабатывали для вестерн-блоттинга, как описано ниже. Для иммуногистохимии срезы корональной ткани толщиной 20 мкм делали на микротоме-криостате, замораживали на предметных стеклах Superfrost ultra plus (Thermo Scientific) и хранили при -20°C до дальнейшей обработки. Животных в возрасте P7, контроль (n=5) ENV (n=5) и P59-70 контроль (n=5) ENV (n=5) анестезировали пентобарбиталом (50 мг/кг) и транскардиально перфузировали 4% параформальдегидом в 0,1 М фосфатном буфере. Мозг удаляли и постфиксировали в течение ночи при 4°C , и с помощью вибратора VT1200S Leica готовили срезы толщиной 50 мкм. Срезы трижды промывали PBS и оставляли в 0,03% кислом PBS при 4°C для последующего использования.

Иммуногистохимия/окрашивание TUNEL

Перфузируемую ткань блокировали и пермеабелизировали в BSA (Sigma-Aldrich) и 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывки образцы инкубировали с первыми антителами в 2% BSA (Sigma-Aldrich) и 0,2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) в течение ночи при 4°C . Вторые антитела, связанные с флуорофорами Alexa, инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре в том же растворе, что и первые антитела. Срезы смонтировали с использованием Mowiol (Calbiochem) или Vectashield® + DAPI (Vector Laboratories, Бурлингем, Калифорния). Все снимки были получены на видеоконфокальной системе с вращающимся диском (Leica

DMI6000B, 63X) с камерой CoolSNAP HQ2 (Photometrics) или на Nanozoomer (Hamamatsu).

Фрагментацию ДНК исследовали гистологически с использованием флуоресцеиновой системы детектирования апоптоза *in situ* (TUNEL, Promega, Мэдисон, Висконсин). Срезы замороженных тканей животных после электропорации P7, окрашивали в соответствии с рекомендациями производителя и монтировали с Mowiol (Calbiochem).

Вестерн-блот-анализ

Иссеченный гиппокамп контрольных крыс и крыс после электропорации ENV (~P70) подвергали субклеточному фракционированию (Фиг. 6D) для сбора исключительно синапсов (синапсом), синаптических плазматических мембран и синаптических везикул. Ингибиторы протеаз и фосфатаз (ThermoFisher Scientific) прибавляли к изотонической сахарозе для гомогенизации и фракционирования. Концентрацию белка в каждом образце определяли с помощью набора для анализа белка Pierce BCA (ThermoFisher Scientific), и синапсомы от 9 животных в каждом состоянии исследовали в двух отдельных экспериментах. Для детектирования GFP использовали цельные гомогенаты гиппокампа. Авторы использовали простой аппарат WESprotein (Protein simple, bio-technie, Сан-Хосе, США) и пакет для детектирования белка WES-total, а также стандартный пакет WES-standard (12-230 кДа), включающий вторые кроличьи антитела, разбавитель антител, набор белков для определения молекулярной массы («лестницу молекулярной массы»), стрептавидин-HRP, дитиотреитол (DTT), флуоресцентную ПЦР-смесь, люминол-S, пероксид, буфер для образцов и промывочный буфер плюс буфер для детектирования GluN2B относительно PSD-95. Этот комплект также содержит капиллярный картридж и предварительно заполненные микропланшеты. Загружали 0,1 мкг каждого образца и специфические первые антитела, кроличьи анти-GluN2B (Agrobio) и анти-PSD-95 (Cell Signaling, Дэнверс, США). Для дальнейшего анализа были включены только значения в пределах двух стандартных отклонений. GFP обнаруживали с помощью обычного вестерн-блоттинга. Кратко, 20 мкг общего белка загружали в каждую дорожку, разделяли с помощью электрофореза в 4-20% SDS-полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, Hercules, США). Мембрану блокировали в 5% обезжиренном молоке TBS/0,1% Tween 20 (TBST) при комнатной температуре в течение 1 часа. Первые мышинные антитела против GFP (Roche, Базель, Швейцария) разводили в 0,5% молоке в TBST для иммуноблоттинга белков и инкубировали одну ночь при 4°C при перемешивании. Инкубацию с HRP-конъюгированным антимышиным IgG (Jackson

Immunoresearch Laboratories, Вест Грив, США) проводили в течение 2 ч при комнатной температуре. Специфические полосы белка выявляли с помощью Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad), а мембраны анализировали с помощью Versadoc (Bio-Rad).

Подготовка фигур и анализ

Фигуры были получены в программном обеспечении ImageJ (NIH) и Adobe Photoshop (Adobe Systems, Сан-Хосе, Калифорния), для оптимизации качества снимка отрегулировали только контрастность и яркость. Весь статистический анализ был выполнен в GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Сан-Диего, США). Кратко, был проведен статистический анализ с использованием альфа = 0,5. Для поведенческих исследований заранее определенный размер выборки был основан на литературных данных. Здесь в РРІ использовали размер выборки 13-18 животных, что соответствует коэффициенту мощности 0,6-0,75 и $\alpha = 0,5$, а в экспериментах с перекрестными связями и МК-801 размер выборки 11 животных соответствует коэффициент мощности 0,55 и $<0,8$, соответственно. Параметрические статистические тесты применялись, когда данные проходили комплексный тест нормальности Д'Агостино и Пирсона, в этой связи был использован двусторонний t-критерий Стьюдента с поправкой Уэлча или без нее, одно- или двусторонний парный t-критерий Стьюдента или двусторонний дисперсионный анализ с последующими множественными сравнениями Бонферрони. Сравнения между группами с данными из негауссовских распределений проводили с использованием непараметрического критерия: либо двустороннего непарного критерия Манна-Уитни, либо, для нескольких групп, критерия Крускала-Уоллиса с последующим критерием множественных сравнений Данна. Для прямого сравнения распределений использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Для поведенческого исследования результаты РРІ проанализировали с использованием группы факторов и предимпульса с помощью двустороннего дисперсионного анализа ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Бонферрони для группы и интенсивности предимпульса. Односторонний анализ ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки использовали в протоколах перекрестной связи и нейтрализующих антител. Двусторонний дисперсионный анализ RM с учетом обработки факторов и времени с последующим апостериорным анализом LSD Фишера использовали для анализа ответа МК-801 и двухфакторного дисперсионного анализа данных TUNEL с обработкой факторов и площадью. Уровни значимости были определены как *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

ПРИМЕР 1: Воздействие сыворотки психотических пациентов на нейрональные рецепторы нейротрансмиттеров

В первом эксперименте авторы собрали сыворотки пациентов с психотическими расстройствами (шизофренией и биполярным расстройством) или контрольных здоровых участников, чтобы проверить их влияние на содержание ключевых рецепторов нейротрансмиттеров в нейронных сетях гиппокампа, содержащих нейроны, астроциты и микроглию (Фиг. 1А-С). Независимо от глутаматергических рецепторов AMPA (субъединица GluA1) и NMDA (субъединица GluN1), дофаминергических D1 и ингибиторных GABA_A (субъединица gamma2) рецепторов, сыворотка психотических пациентов специфически уменьшала кластеры рецепторов NMDA (NMDAR) (Фиг. 1D). Следует отметить, что у этих пациентов также наблюдался высокий уровень провоспалительного цитокина, интерлейкина-1бета (IL-1 β), по сравнению с контрольными субъектами (Фиг. 1А и В). Поскольку авторы использовали сыворотку от психотических пациентов, это изменение NMDAR со специфическими характеристиками, выявленными в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, как описано в следующих примерах, согласуется с присутствием HERV-W ENV в исследуемых сыворотках (антигенемия). Как также описано в следующих примерах, это также согласуется с предположением о патогенности HERV-W ENV, в которой участвуют IL-1 β и врожденные иммунные свойства микроглии, в отношении специфического нарушения регуляции нейрональной синаптической функции NMDAR. Что наиболее важно, это также согласуется с открытием новой нозокомиальной группы, представленной подгруппой пациентов, объединившей случаи диагностированной шизофрении или биполярного расстройства с повышенным уровнем провоспалительных цитокинов в сыворотке, включая IL-1 β . У пациентов, включенных в эту новую биологически определяемую нозологическую группу, была диагностирована либо шизофрения, либо биполярное расстройство.

ПРИМЕР 2: HERV-W ENV запускает высвобождение специфических цитокинов из микроглии с синергическими нейропатогенными эффектами

Удивительно, когда культуры нейронов без глии (без астроцитов или микроглии) подвергали воздействию рекомбинантного ENV, синаптическая динамика GluN2B-NMDAR оставалась стабильной (Фиг. 2А и В). В присутствии микроглии в культурах нейронов провоспалительная бактериальная молекула липополисахарида, LPS, была способна быстро удалять синаптический GluN2B-NMDAR (Фиг. 3А и В). Однако клетки микроглии, активированные либо LPS, либо ENV, демонстрировали разные фенотипы (Фиг. 3С-Е), что свидетельствует о том, что эти два белка активируют разные сигнальные пути, несмотря на их общее родство к TLR4, что приводит к различным по природе и механизмам воздействиям на нейрональные клетки. При исследовании глиального

медиатора, высвобождаемого глиальными клетками при инициирующем воздействии ENV, авторы измерили *in vitro* высокий выброс провоспалительных цитокинов, особенно IL-1 β , в среде культур, воспроизводящих сети гиппокампа (Фиг. 2D). Чтобы проверить, играют ли эти цитокины, особенно IL-1 β , непосредственную роль в синаптической дестабилизации NMDAR с помощью ENV, сети гиппокампа подвергали воздействию ENV вместе с различными блокаторами цитокинов. IL-1ra (250 нг/мл), природный антагонист рецептора IL-1 (IL-1R), обратил индуцированное ENV удаление GluN2B-NMDAR из синапсов. Блокирование IL-6 (1 мкг/мл) или TNF- α (1 мкг/мл) лишь частично снижало эффект и не приводило к полной блокаде (Фиг. 2E). Более того, одного IL-1 β было достаточно для усиления транспорта GluN2B-NMDAR в культурах нейронов без глии (Фиг. 2G). Таким образом, эти данные являются первым свидетельством того, что HERV-W ENV способен быстро удалять синаптические NMDAR посредством глиально- и цитокин-зависимого процесса. В настоящее время показано, что это представляет собой новый механизм, с помощью которого HERV-W ENV может изменять функции нейронов, влияя на распределение нейрорецепторов в синапсах посредством интерлейкина-1, возможно, в синергетическом взаимодействии с IL-6 и/или TNF- α , но нацеливаясь на специфический подкласс нейрорецепторов. (GluN2B-NMDAR). Более того, несмотря на возможную индукцию несколькими провоспалительными агонистами, такими как LPS, наблюдаемые эффекты ENV-индуцированных цитокинов из клеток микроглии также выявили ENV-специфическое влияние на перенос GluN2B-NMDAR в нейрональные синапсы и вокруг них. Таким образом, функциональное изменение функций нейронов с помощью HERV-W ENV оказывается высокоспецифичным как на уровне подкласса глутаматергических нейрорецепторов, так и на уровне опосредованной микроглией продукции воспалительных цитокинов. Так, провоспалительные цитокины и наиболее важный из них, IL-1 β , участвующие в этой специфической дисфункции нейронов, индуцируются не факторами окружающей среды, такими как инфекционные агенты, а самим белком HERV-W ENV, когда он экспрессируется и/или высвобождается в нейронально-глиальной ткани. Поскольку такой специфический эффект IL-1 β , отдельно или в сочетании с IL-6 и/или TNF- α , никогда не описывался и его нельзя было ожидать, становится очевидным, что контекстуальная индукция и синергетические эффекты HERV-W ENV являются ключом к этому специфичному для ENV механизму патогенеза.

Это также раскрывает существование специфического биологического континуума, основанного на этих нейрональных дисфункциях, опосредованных ENV-глией/цитокинами, при психиатрических заболеваниях, классифицируемых до сих пор в

различных диагностических категориях, таких как шизофрения и биполярное расстройство.

Существующие нозологические категории опираются только на психологические оценки с помощью специальных тестов и шкал, а также на клиническую, в основном поведенческую, симптоматику.

Таким образом, настоящее выяснение этой нейрональной дисфункции, вызванной HERV-W ENV, дает причинное, механистическое и биологическое определение, лежащее в основе симптомов и эволюции заболевания в различных диагностических категориях, которое связано с опосредуемым цитокинами синергетическим действием HERV-W ENV и IL-1 β и/или IL-6 и/или TNF- α , на клетки головного мозга.

Таким образом, новая биологически определенная нозологическая группа может включать подгруппы пациентов с шизофренией, биполярным расстройством или другими имеющимися психиатрическими диагнозами на основании детектируемого в настоящее время синергетического эффекта между HERV-W ENV и такими цитокинами. В зависимости, вероятно, от внешних факторов окружающей среды и времени (11), эта экспрессия HERV-W может активироваться в различных областях мозга, в которых синапсы нейронов с GluN2B-NMDAR участвуют в различных поведенческих, когнитивных и других функциях нервной системы. Это также подразумевает нарушение развития нервной системы, когда HERV-W ENV и синергетические эффекты, управляемые цитокинами, возникают во время эмбриогенеза и раннего развития областей и функций мозга. Это неожиданно раскрывает ранее неизвестный патогенный процесс, общий для различных нозокомиальных групп с нынешними психиатрическими диагнозами.

Одним из основных аспектов провоспалительных цитокинов, индуцированных HERV-W ENV, является наличие IL-1 и/или родственных провоспалительных цитокинов, IL-6 и/или TNF-альфа, совместная экспрессия которых наблюдается в описанные в настоящее время экспериментах, но также обнаруживаемых в жидкостях организма этих пациентов (см. пример 5).

ПРИМЕР 3: Специфическое действие HERV-W ENV на NMDAR может быть ингибировано моноклональным антителом *in vitro* и *in vivo*

Большинство психомиметиков (например, PCP) являются антагонистами NMDAR. Несмотря на свою биохимическую природу, то есть белковая макромолекула, которая не может вступать в молекулярные взаимодействия с небольшими химическими соединениями, используемыми для взаимодействия с рецепторами нейрональных

нейротрансмиттеров, HERV-W ENV блокирует NMDAR-опосредованную синаптическую передачу в сетях гиппокампа.

Влияние белка HERV-W ENV на нейрональные рецепторы никогда не описывали, и его нельзя было ожидать, поскольку известно, что этот белок взаимодействует только с рецептором TLR4 (30) и V-бета-цепями Т-клеточного рецептора (31), которые не присутствуют и не экспрессируются в нервных клетках. Более того, эти результаты также представляют собой доказательства того, что HERV-W ENV не влияет на нейрональные рецепторы посредством известных в настоящее время механизмов, поскольку ни NMDAR-опосредованные переходы кальция, ни NMDAR-опосредованные вызванные EPSC не изменялись при различных концентрациях HERV-W ENV (Фиг. 1E-G), что указывает на то, что он не действует как антагонист NMDAR, как это имеет место в случае известных психомиметиков. Таким образом, авторы обнаружили, что HERV-W ENV специфически изменяет трафик NMDAR в синапсах, что может объяснить наблюдаемые эффекты как в случае сыворотки пациентов, так и в случае рекомбинантных или экспрессируемых в тканях белков HERV-W ENV. Чтобы дополнительно изучить возможное объяснение таких нетрадиционных эффектов, два основных подтипа NMDAR в переднем мозге, то есть GluN2A- и GluN2B-содержащие NMDAR, отслеживали в режиме реального времени на поверхности живых нейронов с использованием визуализации одиночных наночастиц (квантовых точек) (Фиг. 1H) (32). Воздействие HERV-W ENV быстро увеличивало GluN2B-, но не GluN2A-NMDAR, мембранную динамику и среднеквадратичное смещение (MSD) в постсинаптическом компартменте (Homer 1c-положительная область; Фиг. 1I-J и Фиг. 4). Таким образом, присутствие белка HERV-W ENV в культуральной среде нейронов индуцирует делокализацию NMDAR, в частности GluN2B-содержащего NMDA-рецептора, из синапсов в постсинаптический компартмент (т.е. нейрональные мембранные области синапса), что приводит к неожиданному удалению рецептора из синапсов с оригинальным профилем, поскольку он также отличается от индуцируемого другой молекулой, связывающей TLR4, то есть LPS.

Было обнаружено, что специфическое антитело, направленное против HERV-W ENV, ингибирует этот патогенный эффект (Фиг. 1K), что выявило специфический эффект, направленный на патогенный потенциал этого белка в отношении таких нейрональных рецепторов. Параллельно с этим, термоинактивированный HERV-W ENV (Фиг. 4C) не показал значительного эффекта по сравнению с контролем, тем самым подтверждая его патогенные свойства в конформации нативного белка. Поскольку этот HERV-W ENV-индуцированный эффект все еще наблюдался в нейронных сетях, лишенных потенциалов

действия тетрадотоксином (TTX) (Фиг. 4D), обнаруженные в настоящее время эффекты в совокупности демонстрируют, что HERV-ENV латерально удаляет синаптический NMDAR специфическим для субъединиц и независимым от активности способом, что не является частью современных знаний о нейропатогенных молекулах, которые взаимодействуют с рецепторами нейротрансмиттеров (33-35).

Чтобы проверить, может ли активация TLR4 неожиданно вызвать этот эффект, в сеть гиппокампа добавили хорошо известный агонист TLR4, липополисахарид (LPS). Соответственно, LPS был способен быстро удалять синаптический GluN2B-NMDAR (Фиг. 3A и B). Однако LPS, который всегда обладал эффектами, сходными с эффектами HERV-W ENV посредством активации TLR4 (30, 36, 37), здесь продемонстрировал другой фенотип, чем был индуцирован действием HERV-W ENV (Фиг. 3C-E). Это позволяет предположить, что два данных белка не используют одни и те же сигнальные пути, если учитывать это оригинальное действие на рецепторы нейротрансмиттеров нейронов. Белок HERV-W ENV индуцирует делокализацию рецептора NMDA, содержащего GluN2B, из синапсов в постсинаптический компартмент (т. е. в области нейрональной мембраны вне синапсов), что приводит к неожиданному удалению рецептора из синапсов с оригинальным профилем, отличающимся от индуцируемого LPS.

Поскольку пациенты с шизофренией могут хронически подвергаться воздействию HERV-W ENV (11), авторы исследовали, как длительное воздействие ENV изменяет свойства сети гиппокампа и поведение животных. После 24 часов воздействия ENV синаптические GluN2B-NMDAR все еще были латерально удалены, этот эффект был полностью заблокирован выбранным антителом против ENV (Фиг. 5A-C). Функционально это привело к устойчивому увеличению частоты NMDAR-опосредованных переходов Ca^{2+} в дендритных шипиках (Фиг. 6A и B), которые со временем стали в большей степени коррелировать друг с другом (Фиг. 6C-D). Эти изменения сетевой активности были модулированы блокадой IL-1 β (Фиг. 6B и D), что согласуется с ранее описанными наблюдениями ENV-опосредованной индукции IL-1 β в микроглии.

Поскольку массовое воздействие HERV-W ENV может не отражать биодоступность белка в мозге пациентов, HERV-W ENV генетически экспрессировали в течение нескольких дней только в 3% клеток гиппокампа (Фиг. 6E). Примечательно, что этого было достаточно, чтобы имитировать общее удаление синаптических GluN2B-NMDAR и сетевых эффектов (Фиг. 6F). Наконец, эти изменения в GluN2B-NMDAR-опосредованной синаптической и сетевой активности должны предсказывать долгосрочные изменения в базальном и пластическом диапазоне глутаматергических

синапсов (38, 39). Соответственно, количество содержащихся в синапсе рецепторов GluA1-AMPA (AMPA) было сильно увеличено в случае нейронов, подвергшихся воздействию HERV-W ENV (Фиг. 6G и 6H). Кроме того, глутаматергические синапсы были не способны подвергнуться химически индуцированной долговременной потенциации (сLTP). После химического стимулирования количество содержащихся в синапсе рецепторов AMPAR фактически уменьшилось, как если бы синапсы подверглись депотенциации (Фиг. 6I и 6J). Следовательно, длительное воздействие HERV-W ENV на клетки гиппокампа имеет серьезные последствия для сетевой активности и NMDAR-зависимой адаптации глутаматергических синапсов. Такие серьезные и согласованные эффекты никогда не были описаны для белка HERV-W ENV, и не ожидалось, что они воздействуют на специфические рецепторы нейротрансмиттеров на таком специфическом и значительном уровне при таких специфических механизмах.

При психотических заболеваниях изменения передачи сигналов NMDAR и синаптической пластичности были связаны с поведенческим дефицитом в когнитивных и сенсомоторных испытаниях (т.е., предимпульсное ингибирование, PPI) (40), которые являются отличительными чертами моделей психозов у грызунов. После постнатальной электропорации электропорированные клетки HERV-ENV наблюдались в астроцитах гиппокампа/радиальных глиальных (GS+) или неглиальных (GS-) клетках (Фиг. 7A). Выживаемость клеток и рост тела были неразличимы между контрольными крысами (только GFP) и крысами ENV (Фиг. 7B и 8A). Кроме того, контрольные крысы и крысы HERV-W ENV+ демонстрировали сходную базальную локомоцию, привыкание и контекстное распознавание без поведенческих признаков тревожности (Фиг. 9H). У взрослых крыс (70-й день после рождения) белки, индуцированные электропорацией, все еще обнаруживались (Фиг. 9F), а экспрессия HERV-W ENV снижала соотношение GluN2/PSD-95 в синапсах гиппокампа (Фиг. 9G). Поразительно, что крысы с экспрессией ENV продемонстрировали усиленную гиперлокомоцию после однократной инъекции психомиметического препарата МК-801 (блокатор каналов NMDAR) (Фиг. 9I), и их производительность в испытании PPI была нарушена по сравнению с таковой у контрольных крыс того же помета (Фиг. 9J). Вместе эти поведенческие результаты показывают, что экспрессии HERV-W ENV в гиппокампе достаточно, чтобы вызвать поведенческие дефициты, связанные с психозом. В поддержку этого утверждения антипсихотическое лекарственное средство клозапин предотвращало изменения в тесте PPI у крыс, экспрессирующих HERV-W ENV (Фиг. 9J, 8C). Наконец, поскольку HERV-W ENV индуцирует специфическую дисфункцию NMDAR посредством оригинального

механизма его латерального удаления, авторы искусственно стабилизировали поверхность NMDAR в гиппокампе крыс, экспрессирующих HERV-W ENV, перед испытанием их производительности в тесте PPI с использованием протокола перекрестных связей GluN1 (Фиг. 9К) (32, 39, 41). Соответственно, такая стабилизация мембранного NMDAR уменьшала вызванное HERV-W ENV нарушение в тесте PPI (Фиг. 9L).

В целом, это исследование демонстрирует, что HERV-W ENV, обнаруженный у значительной части психотических пациентов (12, 42), способен генерировать дисфункцию в организации NMDAR и долговременную пластичность в глутаматергических синапсах. Это удаление синаптического рецептора NMDAR из синапсов вызывает поведенческие нарушения, связанные с психозом. Обнаруженный эффект делает HERV-W ENV терапевтической мишенью, представляющей интерес для новых терапевтических стратегий с новым механизмом действия у психотических пациентов.

Это также демонстрирует, что антитело против ENV может специфически и эффективно обращать и/или предотвращать эти патогенные эффекты на уровне уникального нейронального рецептора нейротрансмиттеров, GluN2B, при воздействии HERV-W ENV посредством его биораспределения в нейронных синапсах. Применение антитела против ENV индуцирует в нейронах перемещение NMDAR, в частности GluN2B-содержащего рецептора NMDA, в синапсы. Этот терапевтический эффект антитела против ENV выражается *in vivo* в обращении или предотвращении поведенческих аномалий, связанных с психозом.

Указанное взаимодействие между HERV-W ENV и глутаматным синапсом, таким образом, вносит новый и неожиданный вклад в наше понимание того, как эндогенные ретровирусы могут играть важную роль в психиатрических заболеваниях. Действительно, теперь становится понятно, что активация HERV-W может изменять развитие и функции глутаматергических синапсов посредством конвергентных, но разных (включая синергетическую индукцию цитокинов) механизмов по сравнению с тем, что было показано на основании предыдущих знаний.

Затем были проведены дальнейшие анализы, которые показали, что неонатальная экспрессия ENV настраивает созревание глутаматергических синапсов и вызывает поведенческие дефициты, связанные с психозом, эффекты, которые устраняются нейтрализующими антителами против HERV-W ENV.

Следующее исследование *in vivo* было задумано с учетом того, что правильное созревание глутаматергических синапсов требует переключения с незрелых, богатых

GluN2B, на зрелые, богатые GluN2A синапсы (44). Указанный фундаментальный процесс происходит в постнатальный период (первые две недели постнатального периода), когда формируются нейронные сети и когнитивные функции. Синаптические изменения, происходящие в это временное окно, часто приводят к поведенческим дисфункциям взрослых, связанным с психическими расстройствами, такими как психоз (44, 45, 46). Учитывая, что синаптическое соотношение GluN2A/2B было изменено *in vitro* с помощью ENV, авторы измерили содержание в синапсах GluN2A- и GluN2B-NMDAR (Фиг. 10А) в конце первой постнатальной недели (P7) и у взрослых (> P65). На этих стадиях встроенные гены явно присутствовали в областях гиппокампа, что наблюдалось с помощью иммуногистохимических и биохимических методов (Фиг. 10В, С). Содержание GluN2A-NMDAR в синапсах увеличивалось по мере развития, тогда как содержание GluN2B-NMDAR уменьшалось (Фиг. 10D, Е). Однако у крыс ENV синаптическое содержание GluN2A-NMDAR уже было увеличено в день P7 ($P = 0,06$), что сглаживает последующий рост развития от P7 до P65 (Фиг. 10D). Синаптическое содержание GluN2B-NMDAR оставалось стабильным у крыс ENV по сравнению с контрольными крысами в обеих возрастных группах (Фиг. 10Е). Таким образом, относительное количество GluN2A и 2B-NMDAR у взрослых постоянно снижалось (Конт.: $1,0 \pm 0,08$, ENV: $0,90 \pm 0,10$, $n = 8$; среднее $\pm$ SEM: * $P = 0,034$, t-критерий Стьюдента). Поскольку в день P7 были явные признаки воспаления (не показано), авторы проверили, может ли изменение взаимодействия между IL-1 β и рецепторами GluN2A-NMDA (47) объяснить раннее изменение синаптического NMDAR. Co-IP между GluN2A-NMDAR и IL1R было значительно увеличено в синапсах ENV-гиппокампа в P7 (Фиг. 5F), тогда как co-IP между GluN2B-NMDAR и IL1R не изменилось. У взрослых животных не было значимой разницы во всех группах (GluN2A/IL-1R: Конт.: $1,0 \pm 0,15$, ENV: $1,04 \pm 0,21$, GluN2B/IL-1R: Конт.: $1,0 \pm 0,08$, ENV: $0,95 \pm 0,09$, $n = 6-7$, среднее $\pm$ SEM, $P > 0,05$). Поскольку ENV потенцирует синаптическое содержание AMPAR в культивируемых сетях гиппокампа (Фиг. 6 G, H), авторы, наконец, сравнили синаптическое содержание AMPAR у взрослых (в день P7 в подавляющем большинстве глутаматергических синапсов AMPAR отсутствуют). Синаптическое содержание было значительно увеличено у крыс ENV по сравнению с контрольными (Фиг. 5G). Общее количество PSD-95 у крыс ENV не изменилось (Фиг. 5H). Таким образом, экспрессия ENV у новорожденных изменяет созревание подтипов NMDAR в процессе развития с преждевременным увеличением синаптического GluN2A-NMDAR, что обусловлено функциональным взаимодействием с сигнальным комплексом рецептора IL1- β . Это ускоренное созревание в передаче сигналов

NMDAR усиливает глутаматные синапсы на более поздних стадиях, вероятно, нарушая их пластическое окно.

Поскольку созревание глутаматергических синапсов происходит в течение первых постнатальных недель, авторы предположили, что негативное влияние ENV на передачу сигналов NMDAR и созревание синапсов заметно в этот период. Для проверки этой гипотезы крысам ENV вводили инъекции ENV-нейтрализующих антител от дня P4 до дня P12 (3 инъекции; Фиг. 5I). У взрослых, хотя вызванный ENV дефицит PPI все еще наблюдался у крыс, получавших контрольное антитело, поведенческая реакция заметно восстанавливалась при лечении ENV-нейтрализующими антителами (Фиг. 10J).

Представленные данные указывают на то, что экспрессия ENV в раннем постнатальном периоде изменяет синаптическое созревание GluN2A/B-NMDAR и вызывает появление поведенческих аномалий у взрослых, которые можно предотвратить и/или восстановить с помощью последовательных инъекций *in vivo* нейтрализующего антитела против HERV-W ENV.

ПРИМЕР 4: Характеристики моноклонального антитела, направленного против белка HERV-W ENV (ENV-W2.3), которое обращает и/или предотвращает аномальное синаптическое распределение в нейронах рецепторов нейротрансмиттеров GluN2B-NMDAR, а также HERV-W ENV-индуцированные эффекты, подобные наблюдаемым у психотических пациентов

4.1 Последовательности варибельного домена легкой цепи антитела ENV-W2.3 (VL)

4.1.1 Нуклеотидная последовательность, кодирующая варибельный домен легкой цепи антитела (VL)

> SEQ ID NO: 12 - GN_ENV-W2.3 -VL

GATATTGTGATGACGCAGGCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACATC
AGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGTAAGGGCATCACTTA
TTTGTATTGGTTTCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATTTATCAGATG
TCCCACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTAGCAGTGGGTCAGGAAGTATG
TTCACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCT
CAAAATCTAGAACTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

4.1.2 Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела

> SEQ ID NO: 7- GN_ENV-W2.3 -VL

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHSGITYLYWFLQKPGQSPQLLIYQM
SHLASGVDPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGTTKLEIK

Аминокислотная последовательность VL вместе с идентифицированными последовательностями CDR представлена на Фигуре 11.

4.2 Последовательности переменного домена тяжелой цепи антитела ENV-W2.3 (VH)

4.2.1 Нуклеотидная последовательность, кодирующая переменный домен тяжелой цепи антитела (VH)

> SEQ ID NO: 13 -GN_ENV-W2.3 -VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGACTGTACTGGCAAGGCCTGGGGCTTCCG
TGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGA
TAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTAGAATGGATTGGTGCTATTTATCCGGGAAAA
AGTGATACTAGCTACAACCAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCAAGTTGACTGCGGTCAC
ATCCGCCAGCACTGCCTACATGGAACCTCACCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGG
TCTATTATTGTACAAGAACCGTCTATGCTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAG
TCACCGTCTCCTCA

4.2.2 Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела

> SEQ ID NO: 8 -GN_ENV-W2.3 -VH

EVQLQQSGTVLARPASVKMSCKASGYSFTSYWMHWIKQRPQGQGLEWIGAIYP
GKSDTSYNQKFKGKAKLTAVTSASTAYMELTSLTNEDSAVYYCTRTVYA
MDYWGQGTSTVTVSS

Аминокислотная последовательность VH вместе с идентифицированными последовательностями CDR представлена на Фигуре 12

3.3 Комплементарные анализы антитела ENV-W2.3

Область VL соответствует перегруппированной и продуктивной последовательности IGK изотипа Каппа, идентичная последовательность для которой не обнаружена в базах данных (Uniprot databank-UniprotKB).

Область VH соответствует перегруппированной и продуктивной последовательности IGH изотипа Ig2a, идентичная последовательность для которой не обнаружена в базах данных (Uniprot databank-UniprotKB).

ПРИМЕР 5: Распознавание эпитопа из двух отстоящих линейных последовательностей в составе белковой последовательности HERV-W (MSRV): индуцированный конформацией белка конформационный эпитоп

Эксперименты проводили на приборе Pepsan, Нидерланды, в соответствии с рекомендациями производителей с использованием планшетов для ELISA, покрытых синтетическими пептидами, перекрывающимися с первичной последовательностью HERV-W/MSRV-ENV. Испытуемое антитело разбавляли от 250 нг/мл до 1 мкг/мл. Считанные значения показывают среднюю люминометрическую ОП, измеряемую с каждым последующим пептидом.

Результаты

Картирование эпитопов с использованием перекрывающихся пептидов из 15 аминокислот по всем последовательностям HERV-W (MSRV-ENV; Genbank ref. AAK18189.1; локус AF331500_1; 542 а.о.) четко идентифицировало два отстоящих участка последовательности, которые были затем обнаружены с помощью ENV-W2.3 антитела (Фиг. 13).

Это ясно указывает на то, что данные последовательности должны быть совместно обнаружены этим антителом в нативном белке с трехмерной складчатой структурой, презентующей эти две области пептида, LFNTTLTRLHE (SEQ ID NO: 10) и LYNHVVP (SEQ ID NO: 11), как смежные детектируемые аминокислоты, то есть в качестве конформационного эпитопа (Фиг. 13).

Детектирование этого эпитопа характеризует данное антитело вместе с последовательностями его CDR и его вариабельных легких и тяжелых цепей (VL и VH).

В заключение, для терапевтического применения у людей обычно требуется гуманизированное антитело или любая иммунотолерантная молекула для лечения пациентов. Таким образом, уникальные характеристики распознавания такого гуманизированного антитела или эквивалентной терапевтической молекулы определяются (i) последовательностями CDR, которые, как хорошо известно, участвуют в распознавании эпитопа и/или (ii) первоначальной структурой конформационного эпитопа, соединяющего два отстоящих линейных участка патогенного белка HERV-W ENV (см. примеры 3 и 4) и/или (iii) его способностью индуцировать в нейронах перемещение NMDAR, в частности GluN2B-содержащего NMDA-рецептора, в синапсы.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает терапевтический продукт для новых назначений для пациентов, ранее диагностированных по симптоматологически и психологически определенным критериям, представлявших подгруппы таких диагностических категорий, и теперь представляющих биологически определенные новые категории, включая охарактеризованные детекцией антигена HERV-W ENV параллельно с повышенными уровнями IL-1beta (>0,05 пг/мл) и/или TNF-alpha (>1,25 пг/мл) и/или IL-6

(>0,5 пг/мл) у пациентов, ранее получивших диагноз «шизофрения» или «биполярное расстройство». Следует отметить, что эти пороговые значения цитокинов в сыворотке различаются в зависимости от наборов, антител, способов и платформ, используемых для их дозирования. Представленные значения являются ориентировочными, и их следует адаптировать в соответствии с инструкциями производителей или оценивать их с помощью данной платформы. В таких случаях, когда экспрессия не ограничивается глубокими тканями мозга, детектирование антигена HERV-W ENV в циркулирующих жидкостях может быть дополнительным и весьма показательным биомаркером.

ПРИМЕР 5: Идентификация новых нозологических единиц, включая подгруппы пациентов с диагнозом шизофрении или биполярного расстройства, на основе детектирования антигена HERV-W ENV и/или других биологических молекул в сыворотке

5.1 Пациенты, материалы и методы

В опытных исследованиях с участием пациентов с диагнозом шизофрении или биполярного расстройства изучались текущие диагностические параметры, обычные лабораторные биологические маркеры и возможность детектирования антигена HERV-W в сыворотке. Плановые лабораторные биологические испытания проводили в соответствии с инструкцией производителя по использованию диагностических наборов, например, для цитокинов, и в целом в соответствии с действующими рекомендациями и правилами для медико-биологических анализов во Франции, где и проводили анализы. Что касается детектирования антигена HERV-W ENV в сыворотке и количественного определения его циркулирующей растворимой формы, все анализы были выполнены в соответствии с условиями, предусмотренными в заявке WO2019201908 (A1) «Способ детектирования растворимой гидрофильной олигомерной формы белка оболочки HERV-W». Результаты для растворимого антигена HERV-W ENV в сыворотке выражены как «Межэкспериментальный стандартизированный результат», соответствующий площади под кривой (AUC) пика специфического растворимого антигена HERV-W ENV, рассчитанный на основе иммунокапиллярной платформы WES, нормализованной к межэкспериментальным вариациям с использованием среднего + 2-х стандартное отклонение для серии здоровых контролей (нижний предел порогового значения специфичности/положительности: CO) в каждом эксперименте, чтобы привести все данные к данным первого эксперимента, используемого в качестве эталона. Таким образом, измеренная AUC каждого образца в каждом другом эксперименте была умножена на отношение соответствующего CO к таковому в первом эксперименте, в

результате чего все значения были приведены к одному и тому же среднему значению неспецифического фонового сигнала, а также с учетом влияния индивидуальной вариации с удвоенным стандартным отклонением, используемая для определения минимального значения специфического сигнала (СО). Хотя вариации не были важны, это оптимизировало дальнейший корреляционный анализ с данными от всех испытуемых, тем самым избегая небольших межэкспериментальных вариаций, влияющих на статистические результаты. Таким образом, все измеренные значения были стандартизованы с СО, равным 15, причем все результаты выше или равные этому значению указывали на специфическое детектирование и количественное определение антигена HERV-W ENV. Ниже этого СО значения соответствуют неспецифическому фоновому сигналу, генерируемому компонентами образца и техническим протоколом с незначительными вариациями среди отрицательных проб («технический шум»).

Чтобы идентифицировать возможные подгруппы, авторы использовали несмещенный двухэтапный кластерный анализ (48), в котором одновременно интегрировали показатели положительности HERV-W (отсечение для положительности: $IESR > 15$; считается категориальной переменной) и цитокинов сыворотки (IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ ; все LN-трансформированные; считаются категориальными переменными) для пациентов с шизофренией (SZ, $n = 29$), биполярным расстройством (BP, $n = 43$) и соответствующих здоровых контролей (HC, $n = 32$). Отсутствующие переменные для некоторых участников привели к уменьшению размера выборки. Итоговое количество субъектов, включенных в кластерный анализ, составило: $n(HC) = 29$, $n(SZ) = 18$ и $n(BP) = 30$. Кластерный анализ проводили без предварительного определения количества кластеров, что позволило избежать систематической ошибки в отношении определения количества возможных кластеров. Байесовский критерий (BIC) использовали для оценки максимального количества кластеров, тогда как метод логарифмического правдоподобия использовался в качестве меры расстояния [1]. После стратификации пациентов с HC, SZ и BP на подгруппы, сывороточные цитокины и клинические переменные (возраст начала заболевания, оценка по шкале оценки депрессии Монтгомери-Асберга [MADRS], оценка по шкале оценки мании Янга [YMRS], оценка по шкале положительных и отрицательных синдромов [PANSS] и ежедневные эквиваленты хлорпромазина [CPZ]) анализировали с помощью одностороннего или двустороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным тестом Тьюки для множественных сравнений, когда это уместно. Все статистические анализы были выполнены с использованием SPSS Statistics (версия 25.0, IBM, Армонк, штат Нью-Йорк,

США) и Prism (версия 8.0, программное обеспечение GraphPad, Ла-Хойя, Калифорния) со статистической значимостью, установленной на уровне $p < 0,05$.

5.2 Результаты

Пациенты с диагнозом шизофрения (SZ), биполярное расстройство (BP) и здоровый контроль без известных психических, воспалительных, инфекционных или метаболических заболеваний (HC), дали информированное согласие на участие в многопараметрическом исследовании, утвержденном соответствующим этическим комитетом, включая клиническое исследование и обработку данных параллельно с детектированием и/илиопределением количества сывороточных биомаркеров, включая антиген HERV-W ENV и цитокины сыворотке.

Данные, собранные у пациентов и контрольной группы, представлены на Фиг. 14.

На Фиг. 14a представлена распространенность положительных антигенов ENV HERV-W в сыворотке для групп HC, SZ и BP. Доказана статистически значимая и важная разница между здоровым контролем и психотическими пациентами либо с SZ ($p < 0,001$), либо с BP ($p < 0,01$), среди которых была идентифицирована подгруппа HERV-W ENV-положительных пациентов.

Эти результаты были дополнительно проанализированы на предмет потенциальной корреляции или совместной стратификации (кластерный анализ) с другими параметрами. Значительная кластеризация была фактически обнаружена при повышенной концентрации некоторых цитокинов в сыворотке. На Фиг. 14b представлена прогностическая значимость соответствующих сывороточных значений в кластерном анализе, объединяющем эти параметры, демонстрируя преобладающую прогностическую способность антигена HERV-W ENV, за которой следует провоспалительные цитокины, такие как IL-6, IL-1 β и, в меньшей степени, TNF- α . Кластерный анализ выявил наличие двух кластеров во всех исследованных популяциях, разделенных на основе положительности в отношении HERV-W и детекции цитокинов в сыворотке. Кластер 1 (CL1) представляет лиц с отрицательной антигенемией HERV-W ENV и отсутствием обнаруженных цитокинов в сыворотке (или их низкими значениями в пределах нормальных фоновых диапазонов при детектировании соответствующим методом в HC). Кластер 2 (CL2) представляет лиц с положительной антигенемией HERV-W ENV и значительным количеством цитокинов, обнаруженных в сыворотке. На Фиг. 14c представлены доли каждого кластера для групп HC, SZ и BP. Представляется, что почти все HC относятся к CL1, и только один необычный случай относится к CL2. Среди пациентов с диагнозом SZ 50% относились к CL2, а другая половина — к CL1. CL2

охватывал около одной трети всех пациентов с ВР (33,3%), тогда как CL1 охватывал около двух третей. Таким образом, хотя распространенность CL2 у пациентов с психотическими расстройствами значительно отличается по сравнению с практически здоровым контролем, CL2 был более представлен в SZ, чем в ВР. Эти результаты уже указывают на существование важной подгруппы (CL2) пациентов с SZ и пациентов с ВР, характеризующимся положительным статусом HERV-W ENV, связанным с повышенным уровнем цитокинов в сыворотке, тогда как другие пациенты в кластере CL1 не отличались от здоровых контролей по этим биологическим параметрам.

Дальнейший подробный анализ различных цитокинов представлен на Фиг. 14d. Глобально они показывают, что только уровни IL-1 β , IL-6 и TNF- α в сыворотке CL2 значительно отличаются от таковых у НС. Интересно, что гамма-интерферон (IFN- γ) достоверно не определялся. Этот цитокин секретируется Т-лимфоцитами и является индикатором адаптивных иммунных ответов. Следовательно, в отсутствие IFN- γ три цитокина, которые ранее были повышены при CL2, согласуются с провоспалительным профилем, вызванным активацией врожденного иммунитета. Наиболее интересно, что IL-1 β доминировал в CL2 в группе ВР, но не в группе SZ, тогда как IL-6 доминировал в CL2 в группе SZ, но не в группе ВР. TNF- α значительно различался между CL2 и НС в группе ВР, но это также было верно для CL1, и значительно не различался ни в одном кластере в группе SZ. Таким образом, помимо ассоциации HERV-W ENV и детекции провоспалительных цитокинов в сыворотке, CL2 может представлять различное доминирование цитокинов между SZ и ВР. Ассоциация между HERV-W ENV и IL-6 представляется потенциальным биомаркером для CL2 в СЗ, в то время как ассоциация между HERV-W ENV, IL-1 β и, возможно, также и TNF- α , представляется потенциальным биомаркером для CL2 в ВР.

Корреляция и/или кластеризация с клиническими параметрами или параметрами лечения также были выявлены и представлены на Фиг. 15. На Фиг. 15а значимо более молодой возраст начала заболевания в CL2 по сравнению с CL1 ($p < 0,01$) показан только в группе ВР. На Фиг. 15b значимая разница по рейтинговой шкале мании Янга (YMRS) видна между CL2 и CL1 только в группе SZ.

На Фиг. 15с видно, что баллы по шкале положительных и отрицательных синдромов [PANSS] показывают только клинически ожидаемую разницу между группами ВР и SZ для негативных симптомов, независимо от подгрупп CL1 и CL2.

Эти данные, полученные с помощью шкал клинической оценки, используемых для имеющих психиатрических диагнозов, иллюстрируют несоответствие между

классификацией пациентов как «SZ или BP» на основе клинических параметров и классификацией как «CL1 или CL2 с психотическими симптомами» (чтобы исключить НС из CL1) на основании объективных биологических параметров, вызывающих патогенные эффекты.

Наконец, что очень важно, на Фиг. 15d была обнаружена значимая разница между ежедневным потреблением эквивалента хлорпромазина (CPZ) в CL2 по сравнению с CL1 в группе SZ. Этот результат для эквивалента CPZ является стандартной оценкой суточной дозы в схеме антипсихотического лечения пациентов в настоящее время и в данном случае показывает, что пациентам с SZ в CL2 требуются и/или назначаются значительно более высокие дозы, чем пациентам с SZ в CL1. Поскольку другой анализ исключил возможную взаимосвязь различных антипсихотических молекул при детектировании как HERV-W ENV, так и экспрессии провоспалительных цитокинов, настоящее наблюдение согласуется с тем фактом, что пациенты с SZ с критериями CL2 характеризуются более тяжелыми и/или частыми психотическими симптомами, и вследствие этого врачи назначают более высокие дозы для стабилизации состояния пациентов. Весьма интересно, что это наблюдение также совместимо с устойчивостью к антипсихотикам у пациентов из группы CL2, что также не исключает появление более тяжелых и/или частых психотических симптомов, как это было ранее установлено.

Таким образом, хотя эквивалентная шкала для оценки суточной лечебной дозы при BP недоступна, более тяжелое течение заболевания и/или устойчивость к современным антипсихотическим препаратам у пациентов с SZ с биомаркерами CL2 требует использования других стратегий лечения, неявно предполагая нейтрализацию патогенных эффектов биомаркеров CL2 и преимущественно основного предиктора CL2 (Фиг. 14b), то есть белка HERV-W ENV.

Таким образом, многопараметрический анализ данных о клинических, терапевтических и сывороточных биомаркерах из популяции, содержащей здоровых людей и пациентов с диагнозом шизофрения или биполярное расстройство, независимо привел к тем же доказательствам, что и полученные в предыдущих доклинических исследованиях патогенных эффектов HERV-W ENV, призывая к таргетированному лечению, нейтрализующему этот эндогенный ретровирусный белок человека. Таким образом, эффективность антитела по настоящему изобретению *in vitro* и *in vivo* обеспечивает уникальное терапевтическое средство для лечения пациентов с шизофренией или биполярным расстройством и разделения их на кластеры со схожими биологическими параметрами: положительной реакцией на антиген HERV-W ENV и

повышенным уровнем провоспалительных цитокинов, которые могут быть обнаружены в образцах крови, например, в сыворотке (здесь обозначены как CL2).

Лечение пациентов от CL1 с помощью этого антитела неактуально в отсутствие корреляции содержания целевого патогенного белка и повышенного уровня цитокинов. Это означает, что клиническую эффективность данного антитела следует оценивать только у пациентов, соответствующих критериям CL2, как определено в настоящее время, а не в группах пациентов с диагнозом шизофрении и/или биполярного расстройства. Это может соответствовать новым нозологическим определениям или, по крайней мере, вновь выделенным подгруппам больных по двум типам клинических диагнозов (SZ и BP), но наиболее вероятная этиологическая и патогенетическая гетерогенность между пациентами с такими диагнозами согласуется с необходимостью определить соответствующую целевую популяцию, прежде чем применять лечение, специфичное для патогенного белка, который присутствует не во всех случаях. В повседневной практике и реально существующих условиях результаты анализа CL2 также показывают, что дозы IL-1 β , IL-6 и TNF- α в сыворотке могут служить заменителями для обычной классификации CL2.

В заключение, настоящее изобретение обеспечивает неожиданные и важные доказательства (i) ранее неизвестного механизма действия белка HERV-W ENV на нейроны, имеющие отношение к психическим заболеваниям, (ii) наличия нового моноклонального антитела с новыми последовательностями CDR, нацеленного на конформационный эпитоп белка HERV-W ENV, которое ингибирует его недавно обнаруженные патогенные воздействия на нейроны в животной модели психотического поведения/симптоматики, индуцированного HERV-W ENV, а также (iii) новых показаний для правильного терапевтического применения этого нового антитела для лечения соответствующих подгрупп пациентов, у которых в настоящее время диагностирована шизофрения или биполярное расстройство, с новыми критериями на основе биомаркеров, определяющими новые нозологические подгруппы или объекты. Таким образом, эти биомаркеры, вместе или по отдельности, могут использоваться при наличии соответствующих клинических симптомов для правильности назначения точного лечения этим антителом данного пациента.

Список литературы:

1. A. Sekar и соавт., Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 530, 177-183 (2016).
2. S. M. Purcell и соавт., A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia. *Nature* 506, 185-190 (2014).
3. M. Fromer и соавт., De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* 506, 179-184 (2014).
4. N. Grandi, E. Tramontano, Type W Human Endogenous Retrovirus (HERV-W) Integrations and Their Mobilization by L1 Machinery: Contribution to the Human Transcriptome and Impact on the Host Physiopathology. *Viruses* 9, (2017).
5. E. B. Chuong, N. C. Elde, C. Feschotte, Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science* 351, 1083-1087 (2016).
6. R. Ono и соавт., Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat Genet* 38, 101-106 (2006).
7. Y. Sekita и соавт., Role of retrotransposon-derived imprinted gene, Rtl1, in the fetomaternal interface of mouse placenta. *Nat Genet* 40, 243-248 (2008).
8. L. Fasching и соавт., TRIM28 represses transcription of endogenous retroviruses in neural progenitor cells. *Cell Rep* 10, 20-28 (2015).
9. R. Douville, J. Liu, J. Rothstein, A. Nath, Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 69, 141-151 (2011).
10. P. Kury и соавт., Human Endogenous Retroviruses in Neurological Diseases. *Trends Mol Med* 24, 379-394 (2018).
11. M. Leboyer, R. Tamouza, D. Charron, R. Faucard, H. Perron, Human endogenous retrovirus type W (HERV-W) in schizophrenia: a new avenue of research at the gene-environment interface. *World J Biol Psychiatry* 14, 80-90 (2013).
12. H. Karlsson, J. Schroder, S. Bachmann, C. Bottmer, R. H. Yolken, HERV-W-related RNA detected in plasma from individuals with recent-onset schizophrenia or schizoaffective disorder. *Mol Psychiatry* 9, 12-13 (2004).
13. H. Perron и соавт., Molecular characteristics of Human Endogenous Retrovirus type-W in schizophrenia and bipolar disorder. *Transl Psychiatry* 2, e201 (2012).
14. D. Tzur Bitan и соавт., Attitudes of mental health clinicians toward perceived inaccuracy of a schizophrenia diagnosis in routine clinical practice. *BMC Psychiatry* 18, 317 (2018).

15. E. Vieta, M. Berk, B. Birmaher, I. Grande, Bipolar disorder: defining symptoms and comorbidities--Authors' reply. *Lancet* 388, 869-870 (2016).
16. I. Grande, M. Berk, B. Birmaher, E. Vieta, Bipolar disorder. *Lancet* 387, 1561-1572 (2016).
17. A. Lloyd, HIV infection and AIDS. *P N G Med J* 39, 174-180 (1996).
18. H. Perron и соавт., Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet* 337, 862-863 (1991).
19. H. Perron и соавт., Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7583-7588 (1997).
20. J. L. Blond и соавт., Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol* 73, 1175-1185 (1999).
21. S. Levet и соавт., An ancestral retroviral protein identified as a therapeutic target in type-1 diabetes. *JCI Insight* 2, (2017).
22. R. Faucard и соавт., Human Endogenous Retrovirus and Neuroinflammation in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy. *EBioMedicine* 6, 190-198 (2016).
23. H. Perron и соавт., Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Mult Scler* 18, 1721-1736 (2012).
24. S. Noorali и соавт., Role of HERV-W syncytin-1 in placentation and maintenance of human pregnancy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 17, 319-328 (2009).
25. D. J. Stein, C. Lund, R. M. Nesse, Classification systems in psychiatry: diagnosis and global mental health in the era of DSM-5 and ICD-11. *Curr Opin Psychiatry* 26, 493-497 (2013).
26. D. A. Regier, E. A. Kuhl, D. J. Kupfer, The DSM-5: Classification and criteria changes. *World Psychiatry* 12, 92-98 (2013).
27. R. K. Blashfield, J. W. Keeley, E. H. Flanagan, S. R. Miles, The cycle of classification: DSM-I through DSM-5. *Annu Rev Clin Psychol* 10, 25-51 (2014).
28. N. Korver-Nieberg, P. J. Quee, H. B. Boos, C. J. Simons, Group, The validity of the DSM-IV diagnostic classification system of non-affective psychoses. *Aust N Z J Psychiatry* 45, 1061-1068 (2011).
29. A. S. Gonzalez и соавт., Recombinant mutagenic 3ABC protein and monoclonal antibody for quality-control testing in foot-and-mouth disease vaccines. *Antiviral Res* 157, 93-101 (2018).

30. A. Rolland и соавт., The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol* 176, 7636-7644 (2006).
31. H. Perron и соавт., Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology* 287, 321-332 (2001).
32. L. Groc и соавт., Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7, 695-696 (2004).
33. M. B. Assie и соавт., F15063, a potential antipsychotic with dopamine D2/D3 receptor antagonist, 5-HT1A receptor agonist and dopamine D4 receptor partial agonist properties: influence on neuronal firing and neurotransmitter release. *Eur J Pharmacol* 607, 74-83 (2009).
34. R. R. Luedtke, C. Rangel-Barajas, M. Malik, D. E. Reichert, R. H. Mach, Bitropic D3 Dopamine Receptor Selective Compounds as Potential Antipsychotics. *Curr Pharm Des* 21, 3700-3724 (2015).
35. D. Zhu и соавт., Paliperidone Protects SH-SY5Y Cells Against MK-801-Induced Neuronal Damage Through Inhibition of Ca(2+) Influx and Regulation of SIRT1/miR-134 Signal Pathway. *Mol Neurobiol* 53, 2498-2509 (2016).
36. R. H. Johnson, D. T. Kho, O. C. SJ, C. E. Angel, E. S. Graham, The functional and inflammatory response of brain endothelial cells to Toll-Like Receptor agonists. *Sci Rep* 8, 10102 (2018).
37. A. Duperray и соавт., Inflammatory response of endothelial cells to a human endogenous retrovirus associated with multiple sclerosis is mediated by TLR4. *Int Immunol* 27, 545-553 (2015).
38. P. Paoletti, C. Bellone, Q. Zhou, NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383-400 (2013).
39. J. P. Dupuis и соавт., Surface dynamics of GluN2B-NMDA receptors controls plasticity of maturing glutamate synapses. *EMBO J* 33, 842-861 (2014).
40. C. A. Jones, D. J. Watson, K. C. Fone, Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol* 164, 1162-1194 (2011).
41. M. Heine и соавт., Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 320, 201-205 (2008).
42. H. Perron и соавт., Endogenous retrovirus type W GAG and envelope protein antigenemia in serum of schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 64, 1019-1023 (2008).

43. H. Huang и соавт., Chronic and acute intranasal oxytocin produce divergent social effects in mice. *Neuropsychopharmacology* 39, 1102-1114 (2014).
44. P. Paoletti, C. Bellone, Q. Zhou, NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383-400 (2013).
45. R. Birnbaum, D. R. Weinberger, Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 18, 727-740 (2017).
46. O. Marin, Developmental timing and critical windows for the treatment of psychiatric disorders. *Nat Med* 22, 1229-1238 (2016).
47. F. Gardoni и соавт., Distribution of interleukin-1 receptor complex at the synaptic membrane driven by interleukin-1 β and NMDA stimulation. *J Neuroinflammation* 8, 14 (2011).
48. T. D. Purves-Tyson и соавт., Increased levels of midbrain immune-related transcripts in schizophrenia and in murine offspring after maternal immune activation. *Mol Psychiatry*, (2019).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, направленное против белка оболочки (ENV) HERV-W, для применения при лечении группы пациентов с диагнозом психотического заболевания и характеризующихся высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма, в частности, в образце крови, более конкретно в сыворотке, причем указанный цитокин является, в частности, провоспалительным цитокином, таким как, IL-6, IL-1 β и/или TNF- α .

2. Антитело, направленное против HERV-W ENV, для применения по п. 1, где указанный цитокин представляет собой провоспалительный цитокин IL-6 или провоспалительный цитокин IL-1 β .

3. Антитело, направленное против HERV-W ENV, для применения по пп. 1 или 2, где указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из шизофрении, биполярного расстройства, шизоаффективного психоза и шизофреноформного расстройства

4. Антитело против HERV-W ENV для применения по любому из пп. 1 - 3, где указанное психотическое заболевание представляет собой шизофрению или биполярное расстройство.

5. Антитело против HERV-W ENV для применения по любому из пп. 1 - 4, где указанное психотическое заболевание представляет собой шизофрению и указанный цитокин представляет собой провоспалительный цитокин IL-6.

6. Антитело против HERV-W ENV для применения по любому из пп. 1 - 5, где указанное психотическое заболевание представляет собой биполярное расстройство и указанный цитокин представляет собой провоспалительный цитокин IL-1 β .

7. Антитело против HERV-W ENV для применения по любому из пп. 1 - 6, где у пациентов указанной группы детектирован HERV-W ENV.

8. Антитело, направленное против HERV-W ENV, для применения по любому из пп. 1 - 7, где указанное антитело специфически связывается с конформационным эпитопом, определяемым двумя отстоящими линейными последовательностями, представленными SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

9. Антитело, направленное против HERV-W ENV, для применения по любому из пп. 1 - 8, где указанное антитело содержит каждую из 6 областей CDR, представленных 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.

10. Антитело против HERV-W ENV для применения по любому из пп. 1 - 9, где указанное антитело представляет собой химерное моноклональное антитело.

11. Антитело против HERV-W ENV для применения по любому из пп. 1 - 9, где указанное антитело представляет собой моноклональное антитело или гуманизированное моноклональное антитело.

12. Антитело против HERV-W ENV для применения по любому из пп. 1 - 9, где указанное антитело представляет собой IgG.

13. Антитело против HERV-W ENV для применения по любому из пп. 1 - 9, где указанное антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4 или моноклональное антитело IgG1.

14. Антитело, направленное против HERV-W ENV, для применения по любому из пп. 1 - 9, где указанное антитело содержит:

- легкую цепь, где переменный домен (VL) содержит каждую из 3 областей CDR, как показано 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, где переменный домен (VH) содержит каждую из 3 областей CDR, как показано в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, SEQ ID NO: 5 для CDR-H2 и SEQ ID NO: 6 для CDR-H3.

15. Способ диагностики для определения того, принадлежит ли пациент с диагнозом психотического заболевания к подгруппе пациентов с психотическим заболеванием, характеризующихся высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма, включающий:

- 1) количественное определение уровня цитокина, в частности, в образце крови, более конкретно в сыворотке, причем указанный цитокин представляет собой, в частности, провоспалительный цитокин, такой как IL-6, IL-1 β и/или TNF- α ; и

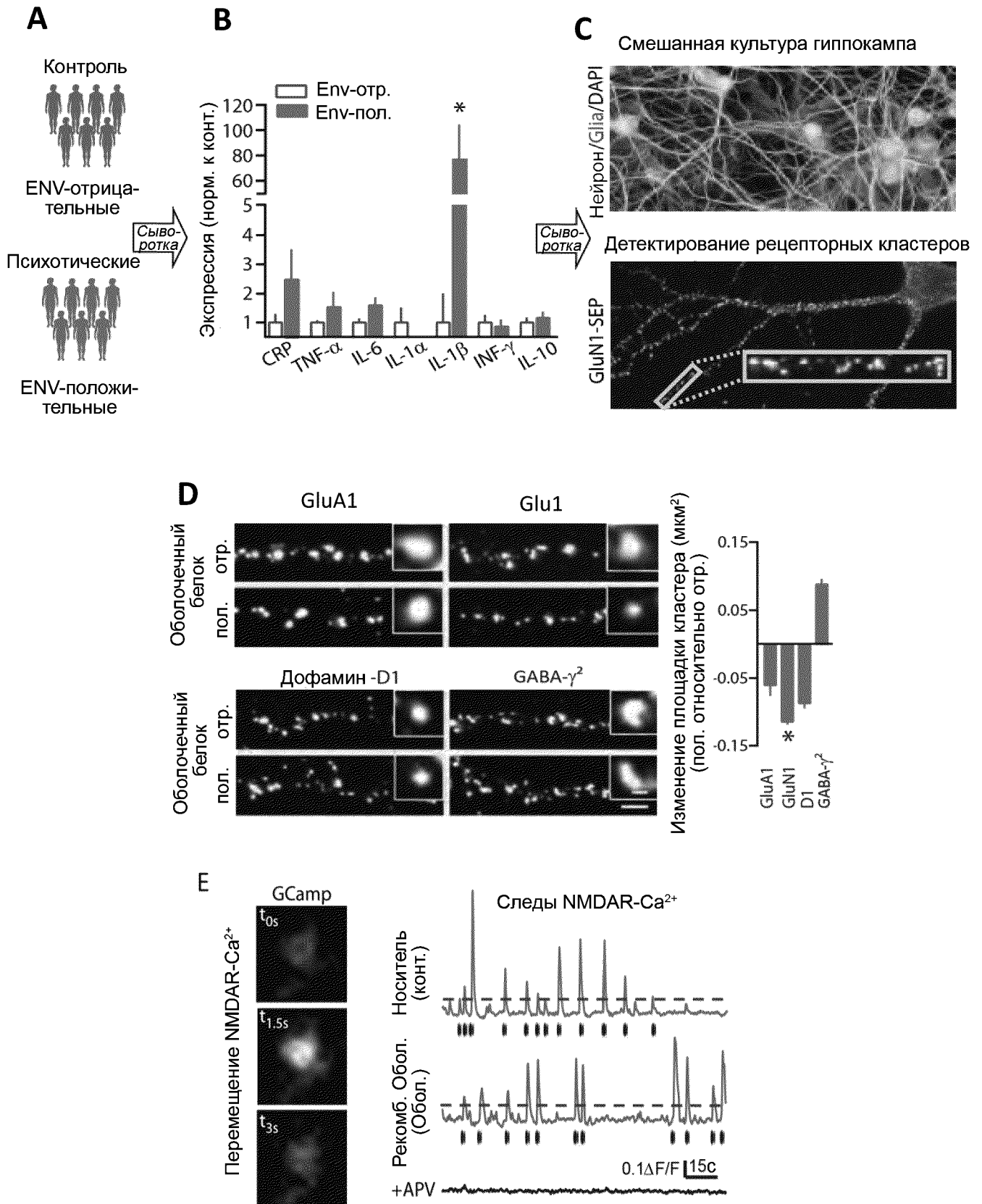
- 2) необязательно, детектирование экспрессии HERV-W ENV.

16. Способ лечения группы пациентов с диагнозом психотического заболевания и характеризующихся:

- высоким уровнем цитокина в образце жидкости организма и/или

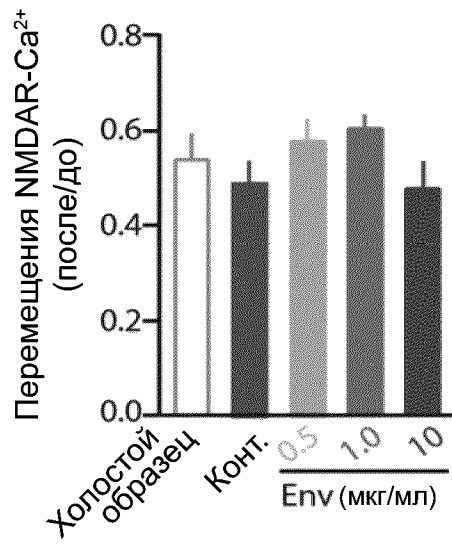
- экспрессией HERV-W ENV, детектируемой в образце жидкости организма,

включающий введение указанным пациентам эффективного количества антитела против HERV-W ENV, в частности, антитела против HERV-W ENV, содержащего каждую из 6 областей CDR, представленных 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.

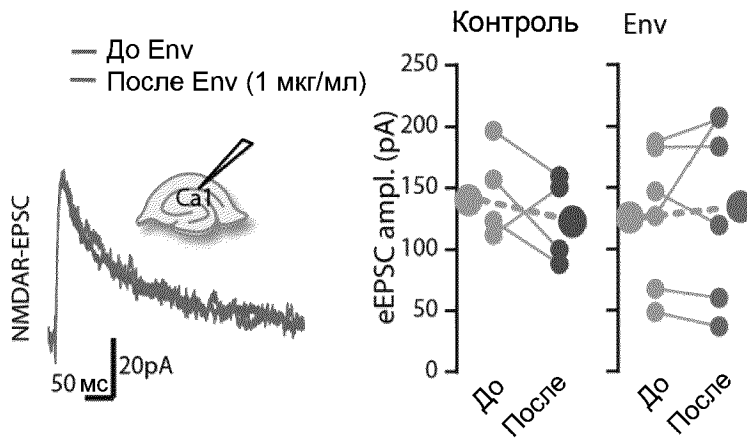


Фиг. 1

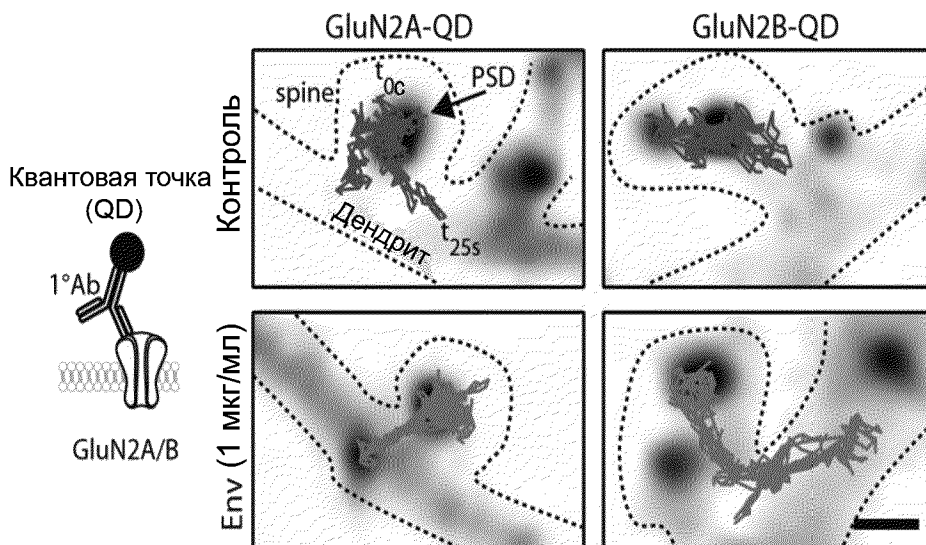
F



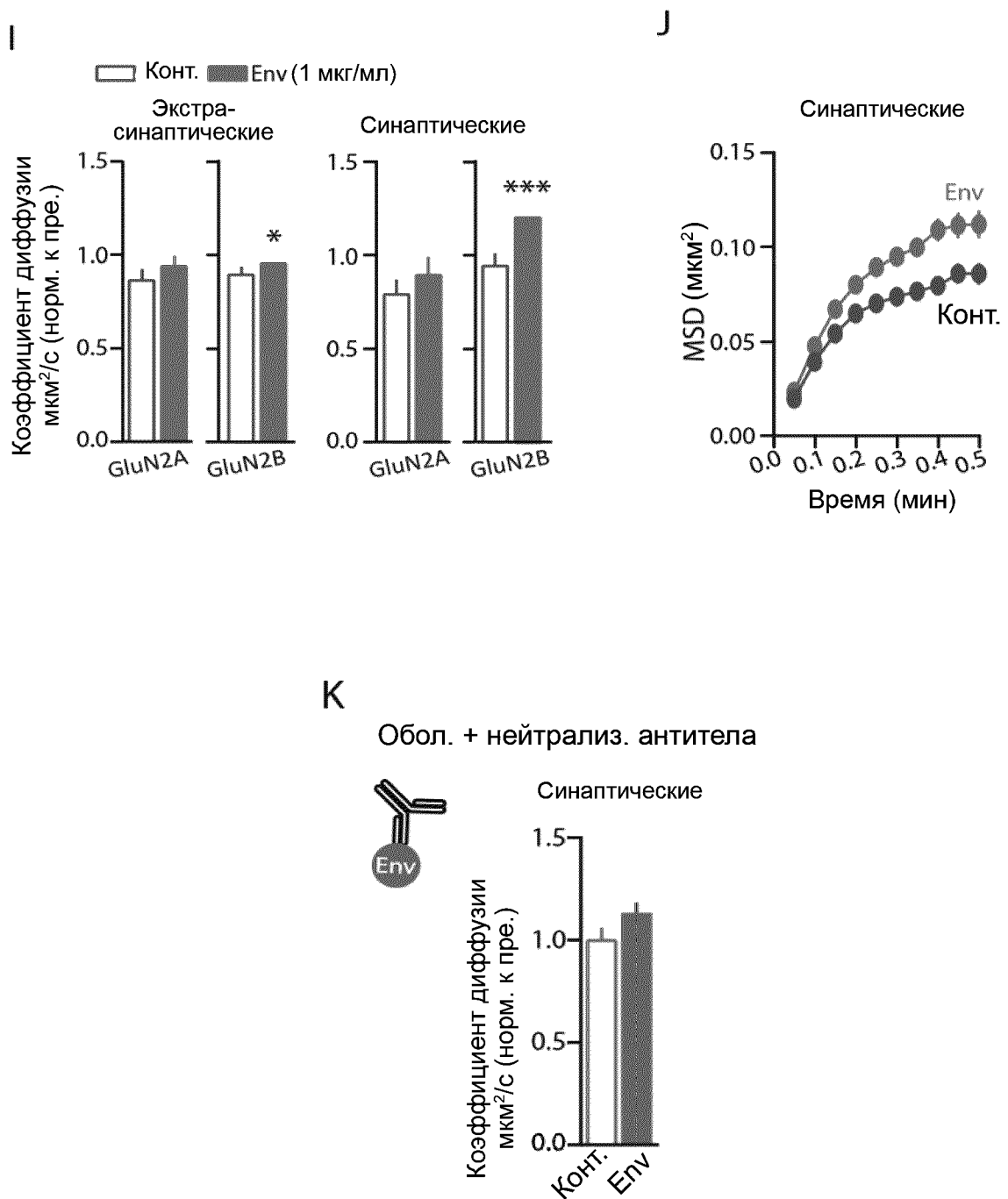
G



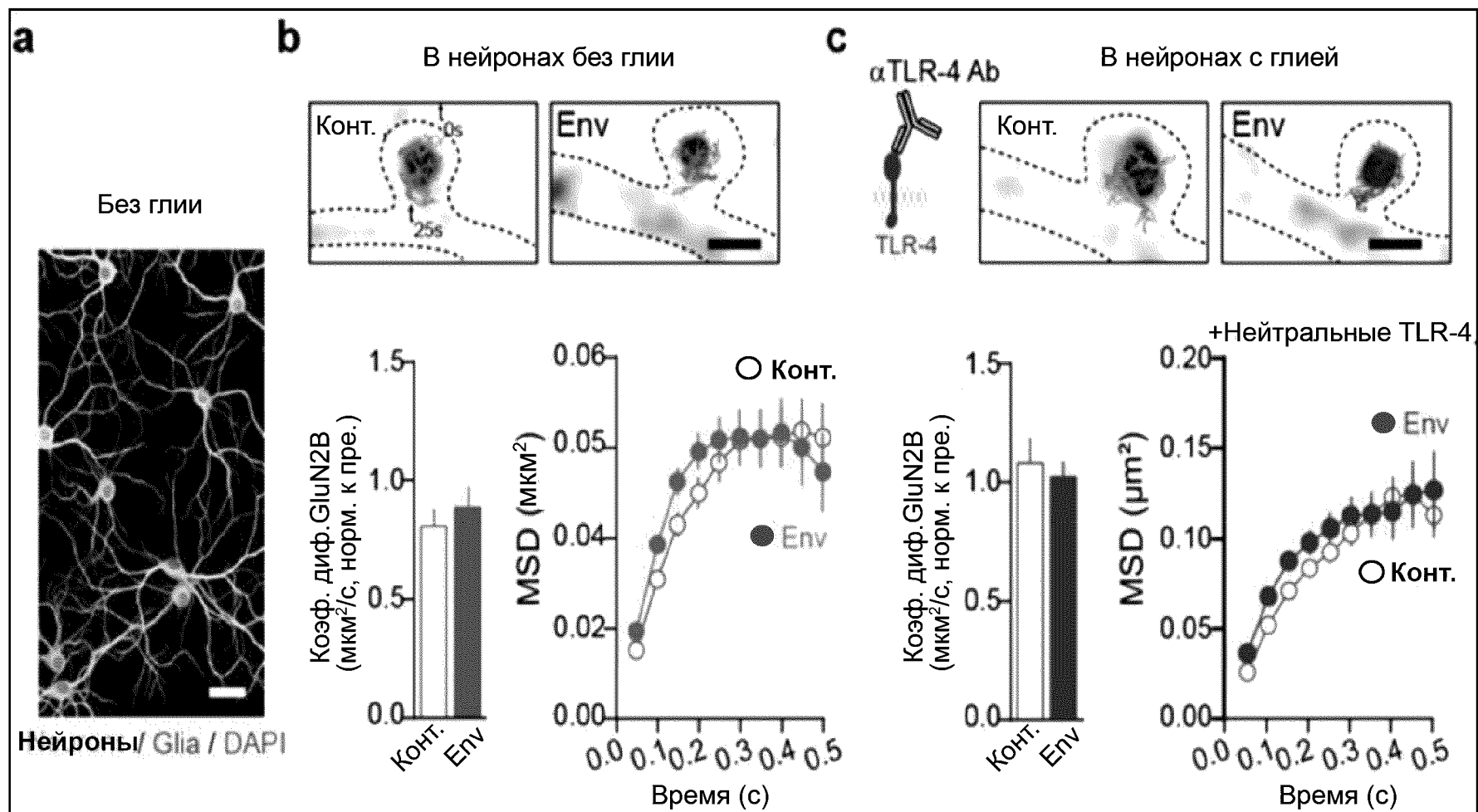
H



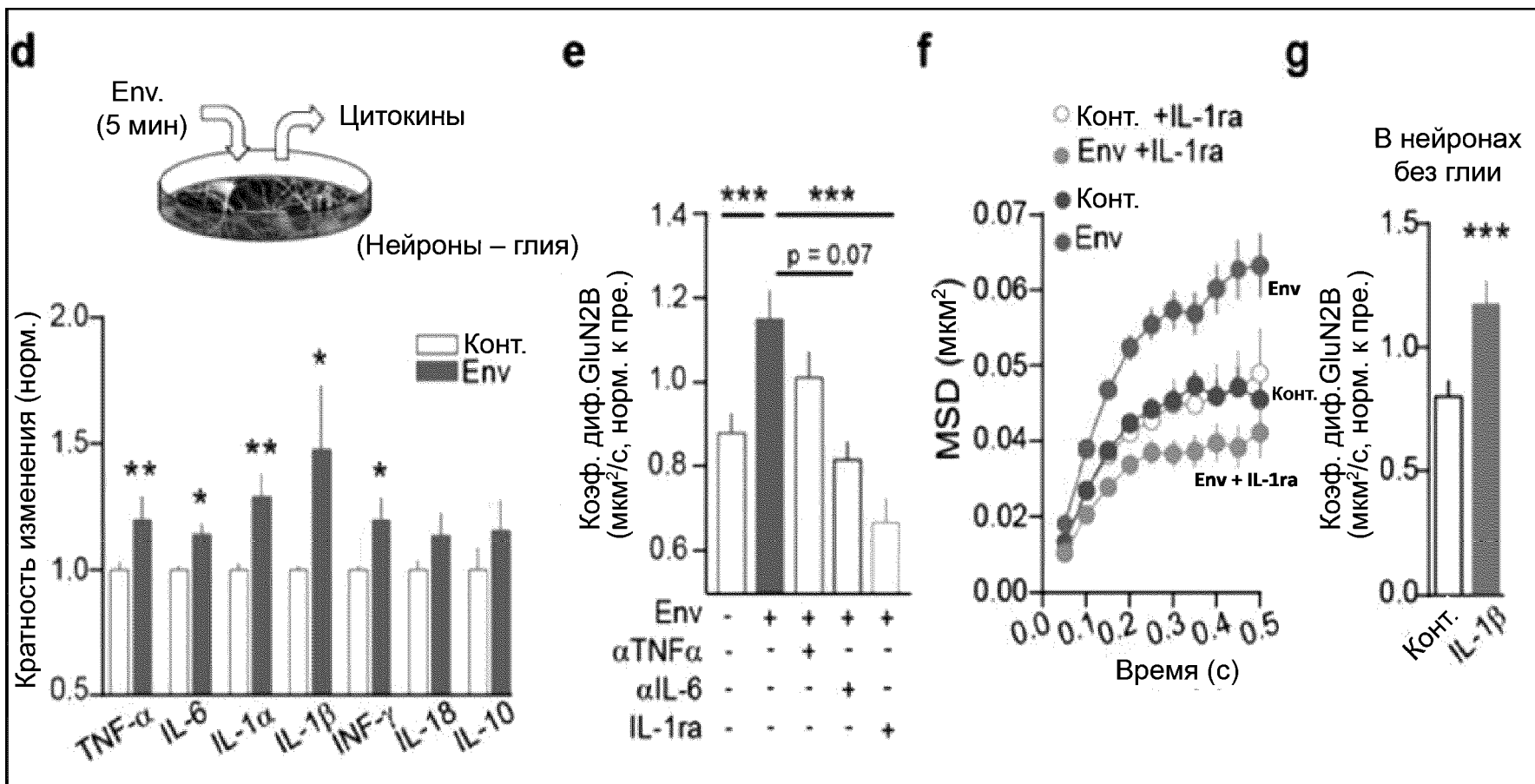
Фиг. 1 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



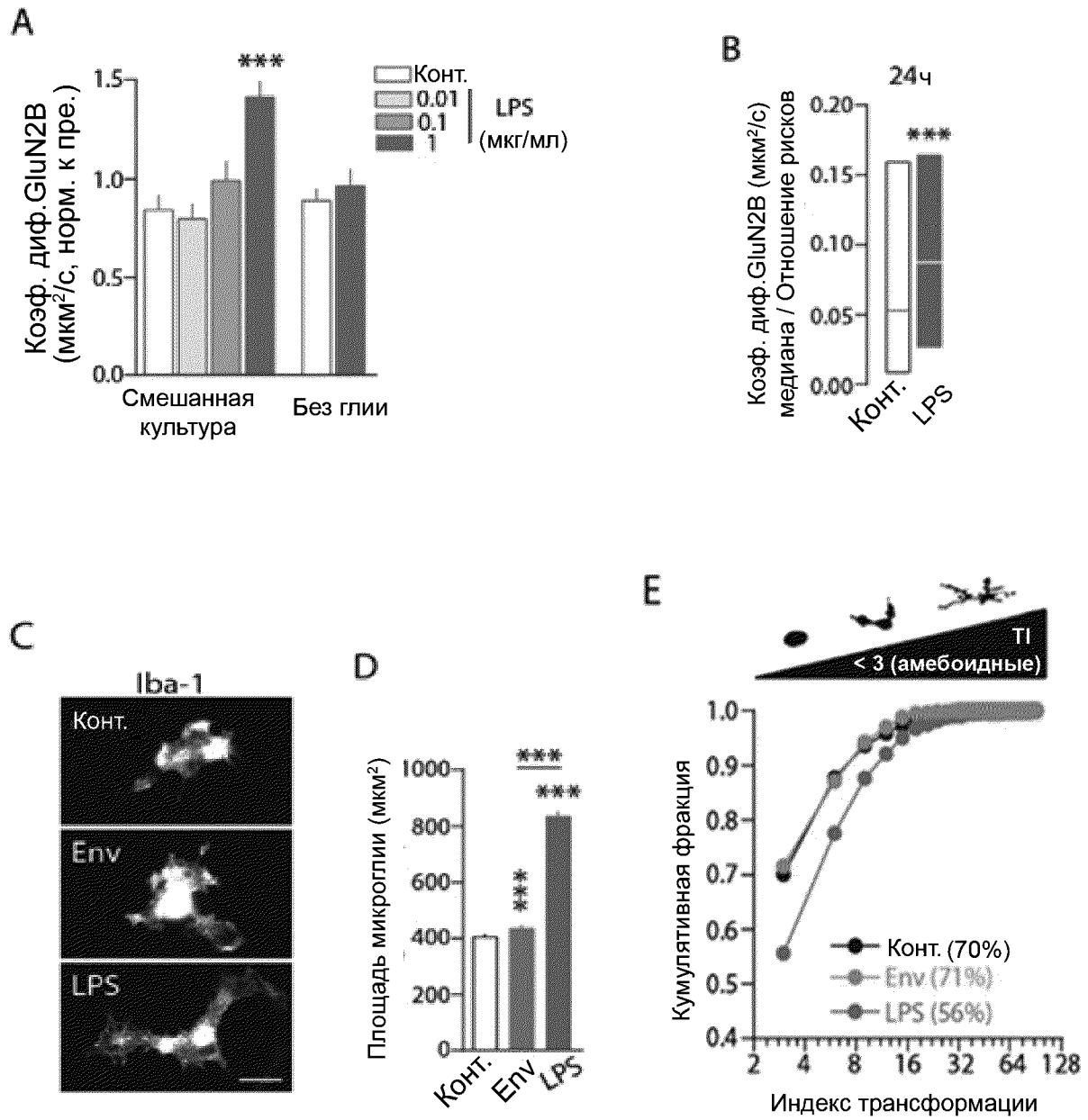
Фиг. 1 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



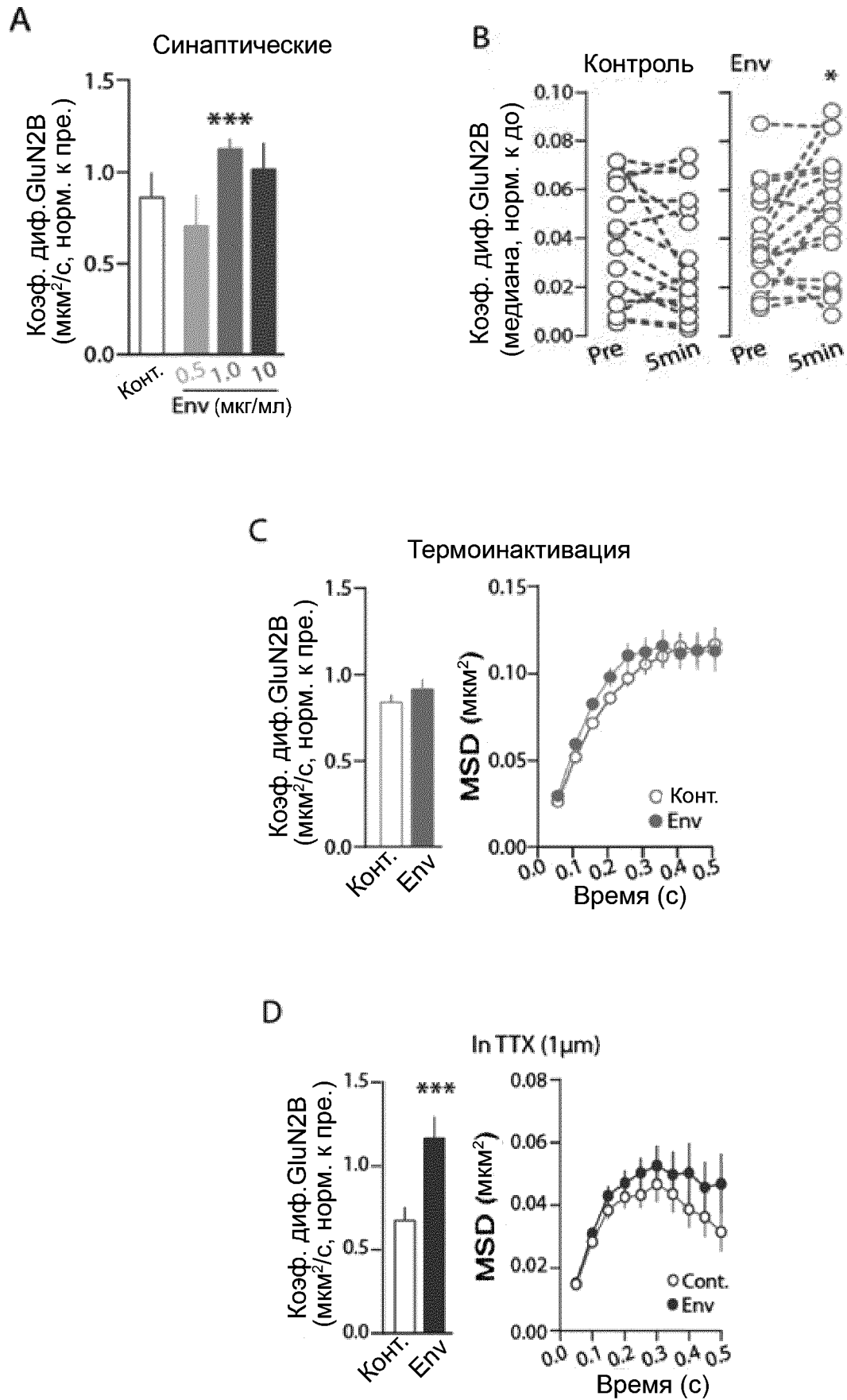
Фиг. 2



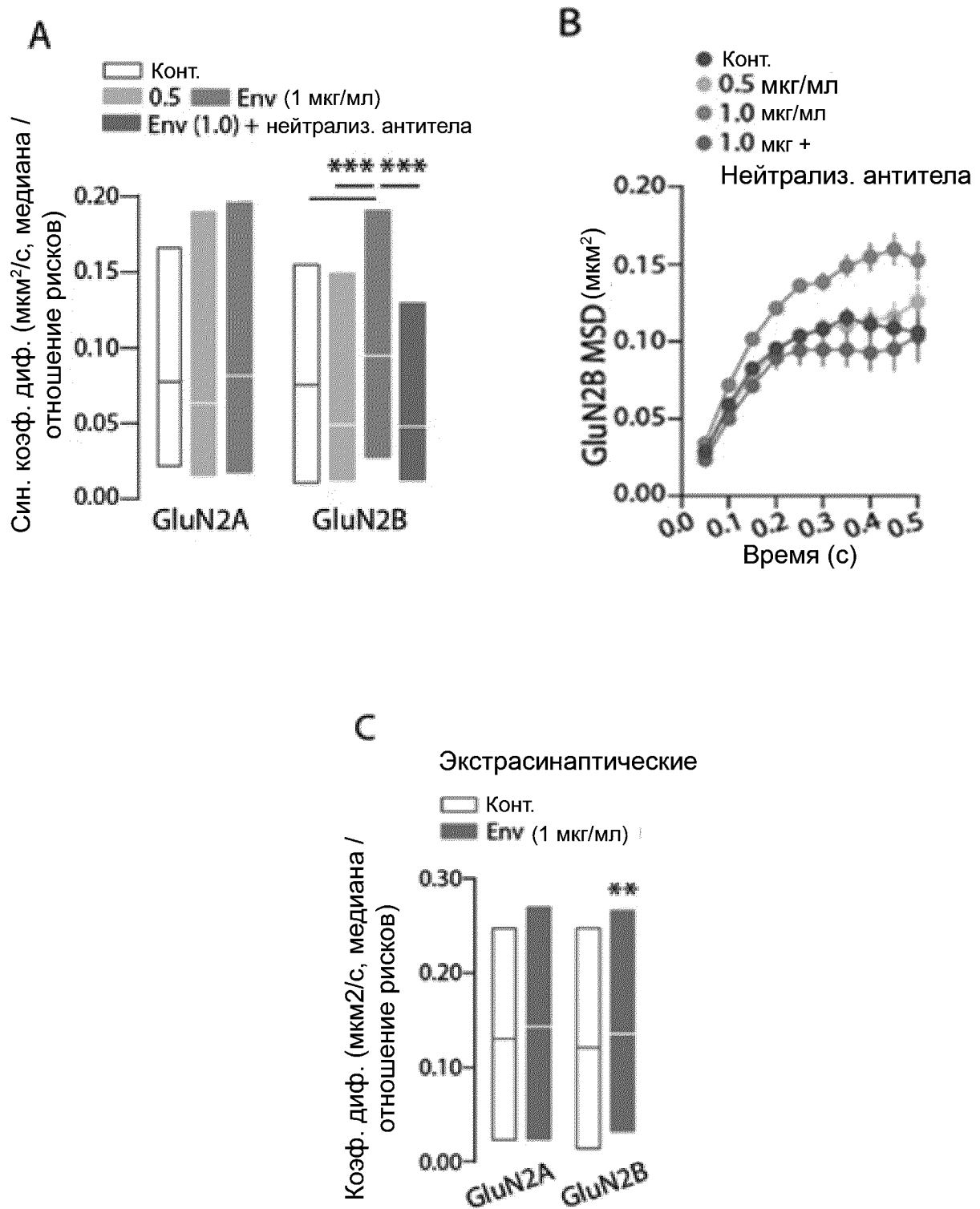
Фиг. 2 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



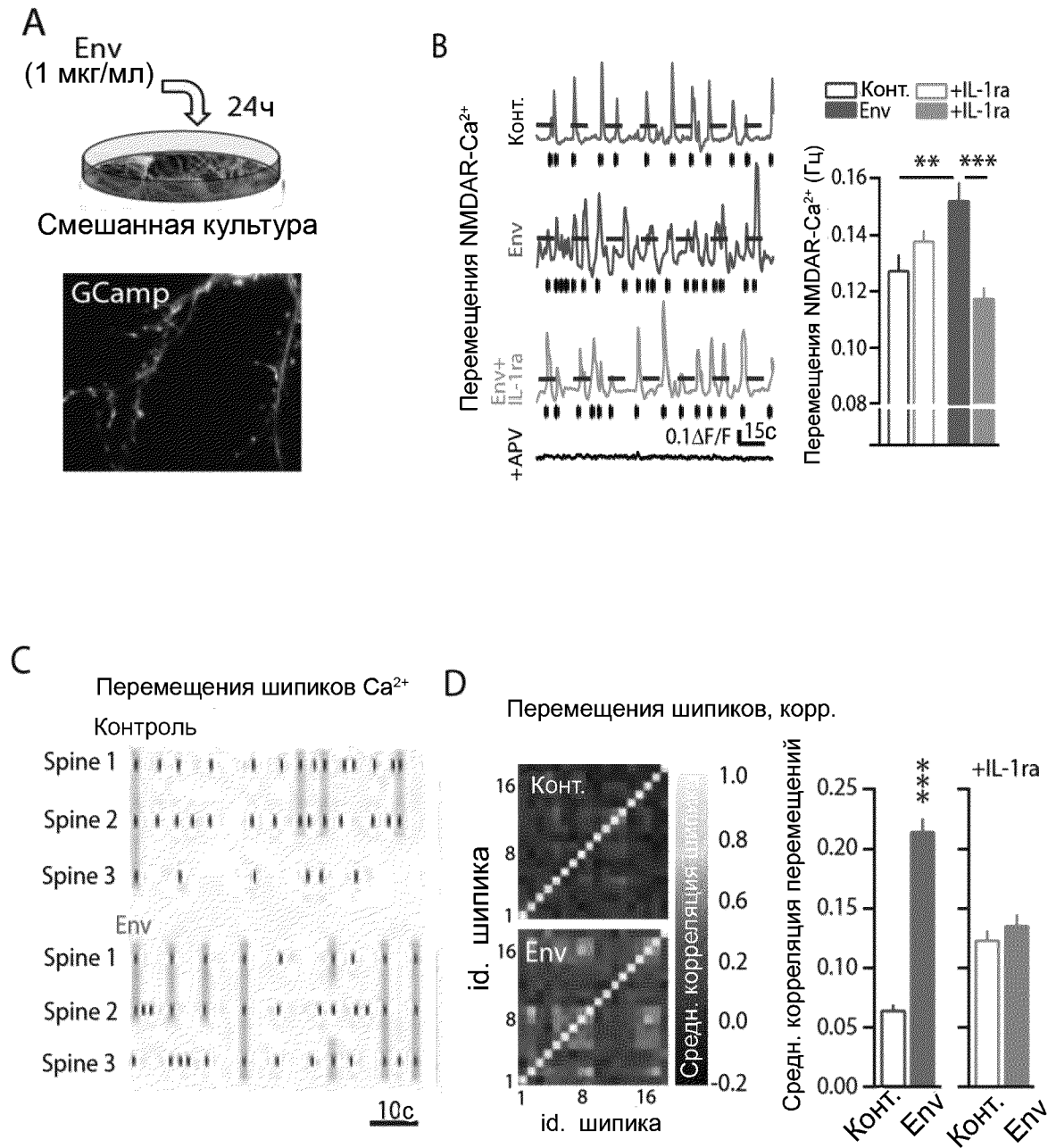
Фиг. 3



Фиг. 4

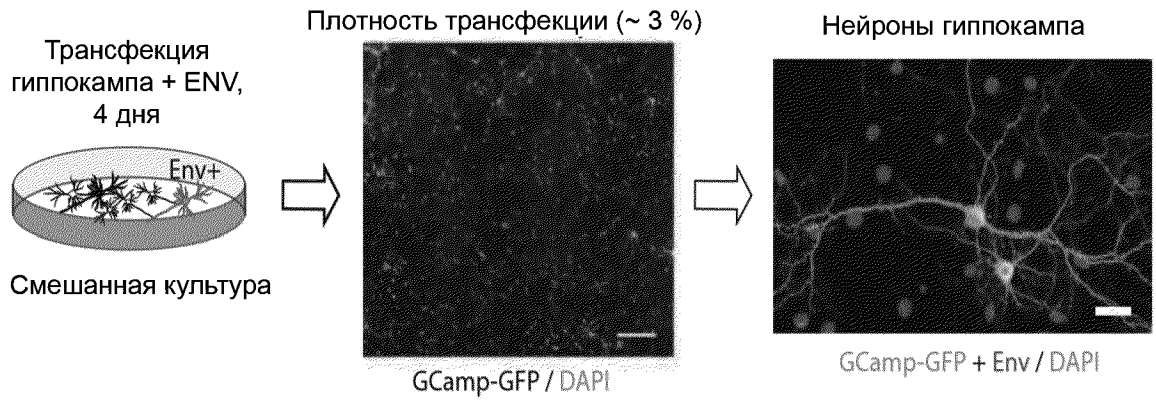


Фиг.. 5

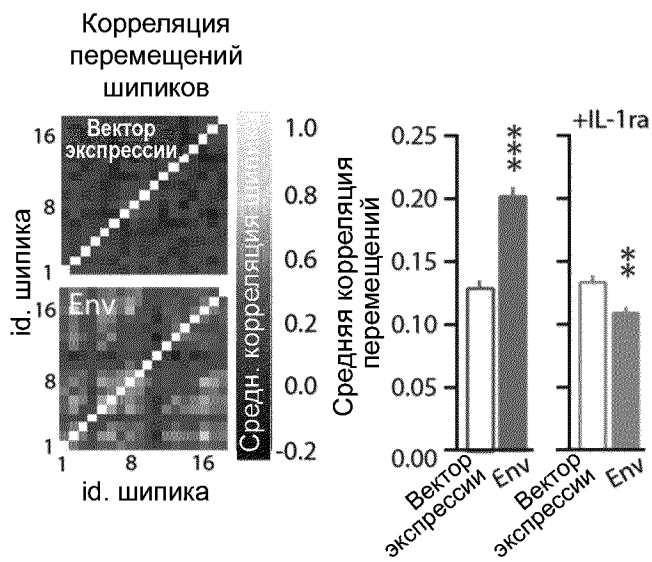


Фиг. 6

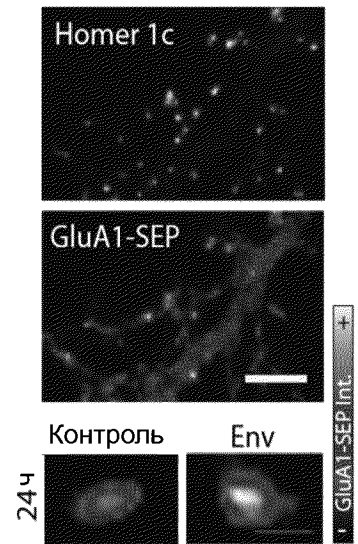
E



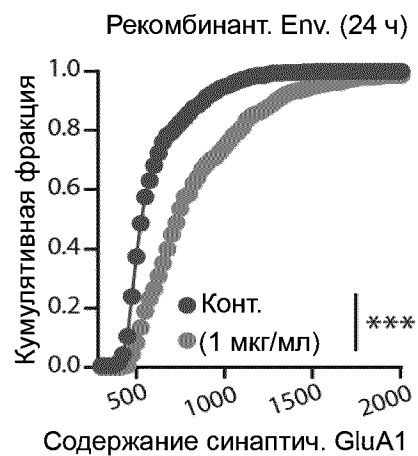
F



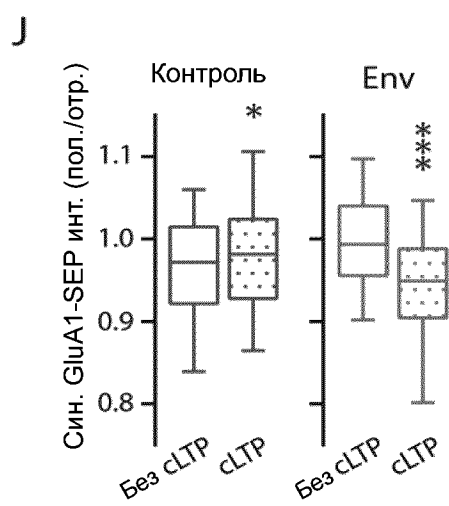
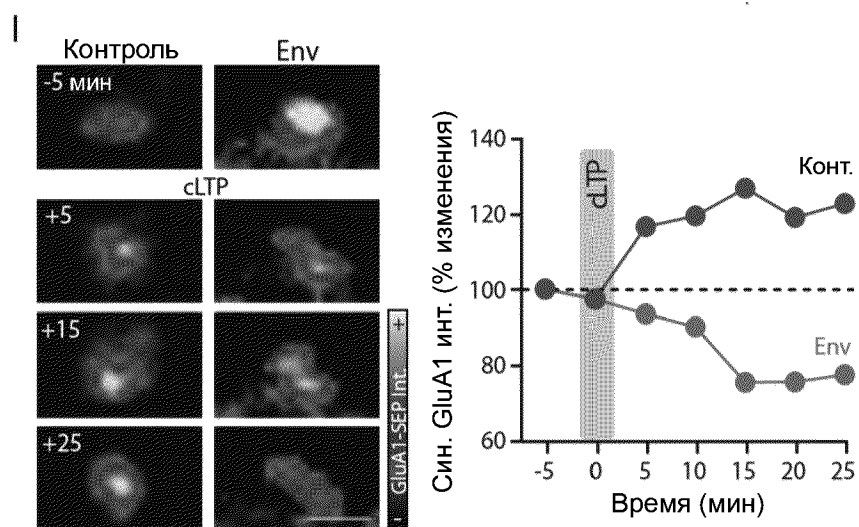
G



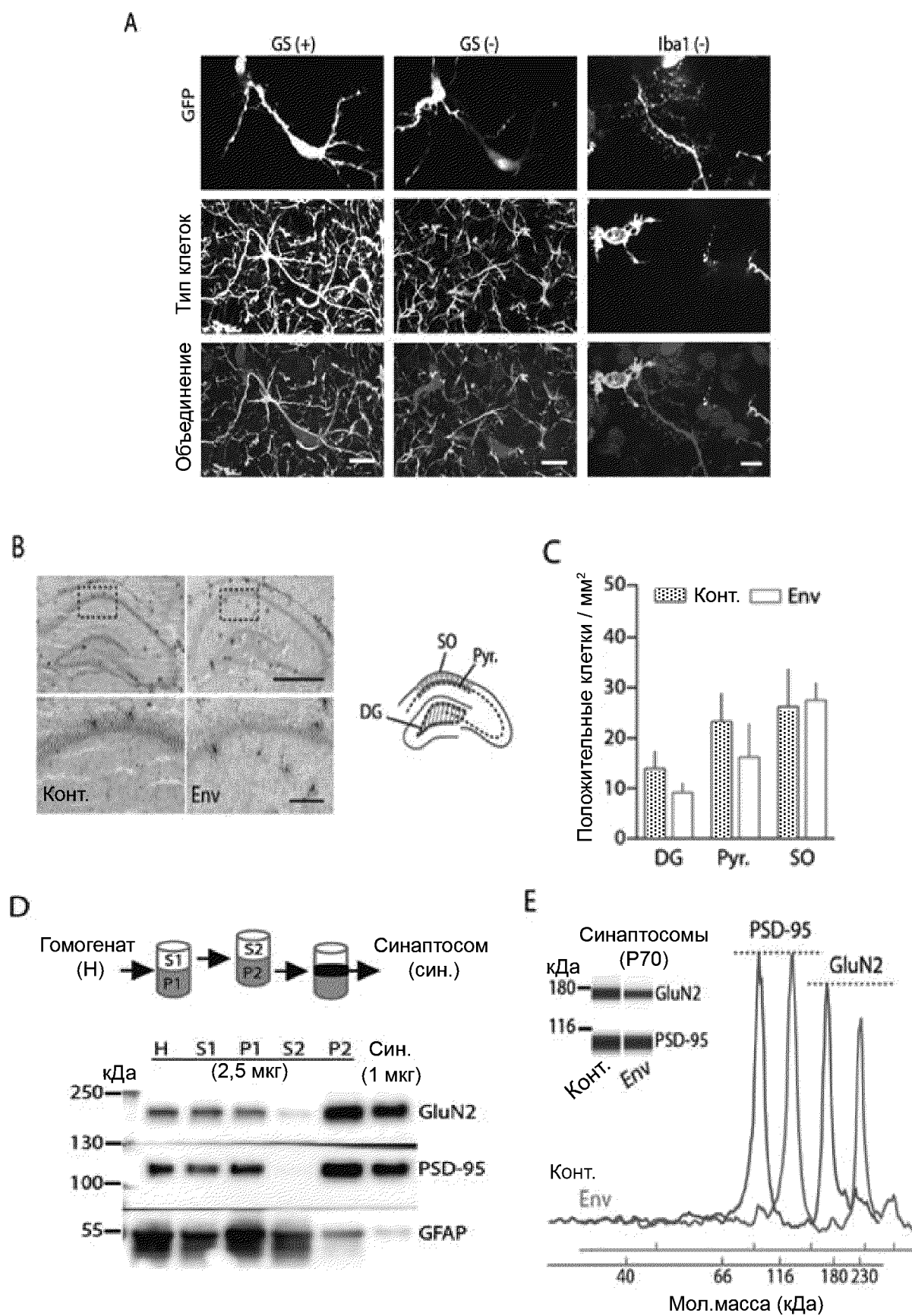
H



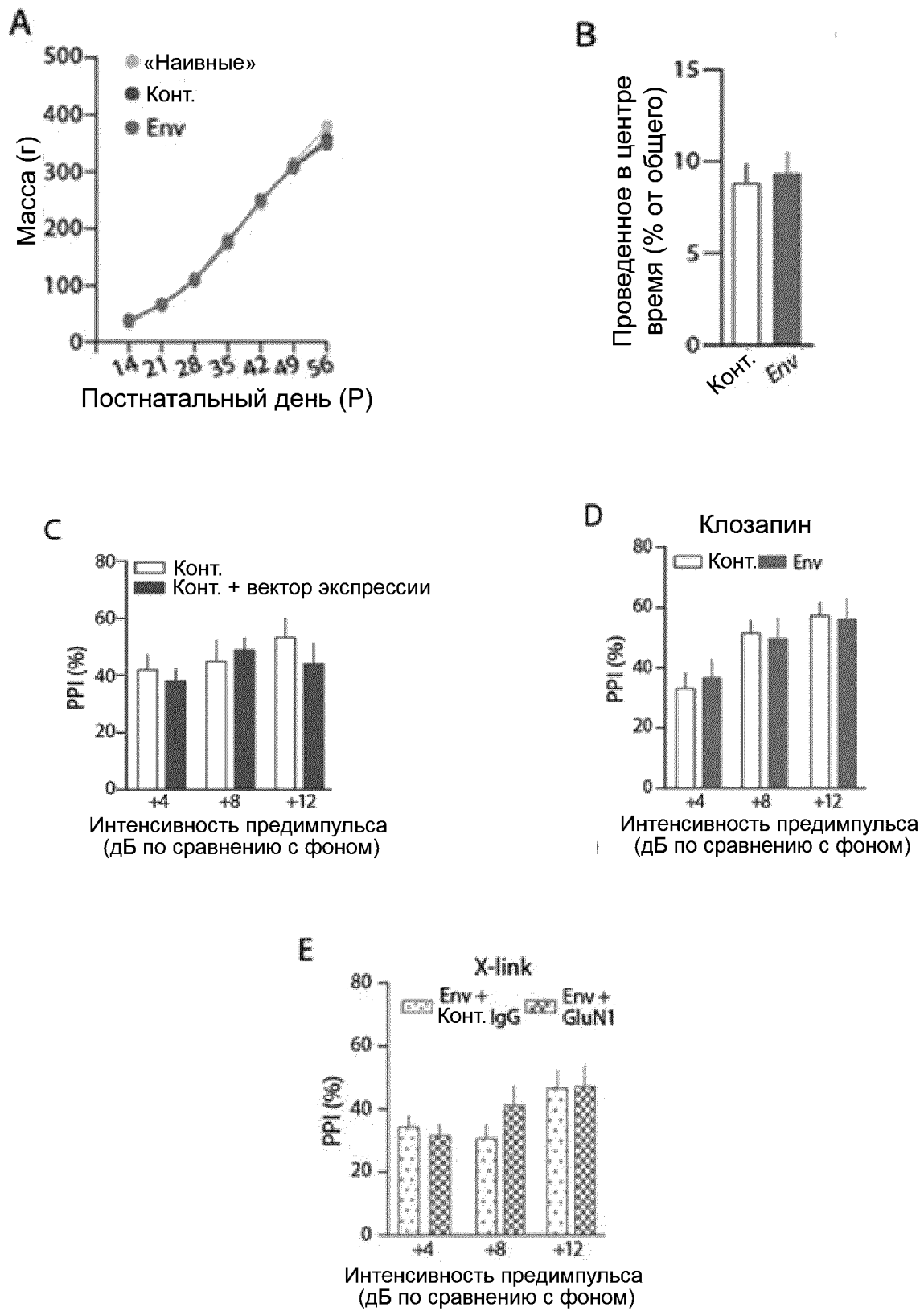
Фиг. 6 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



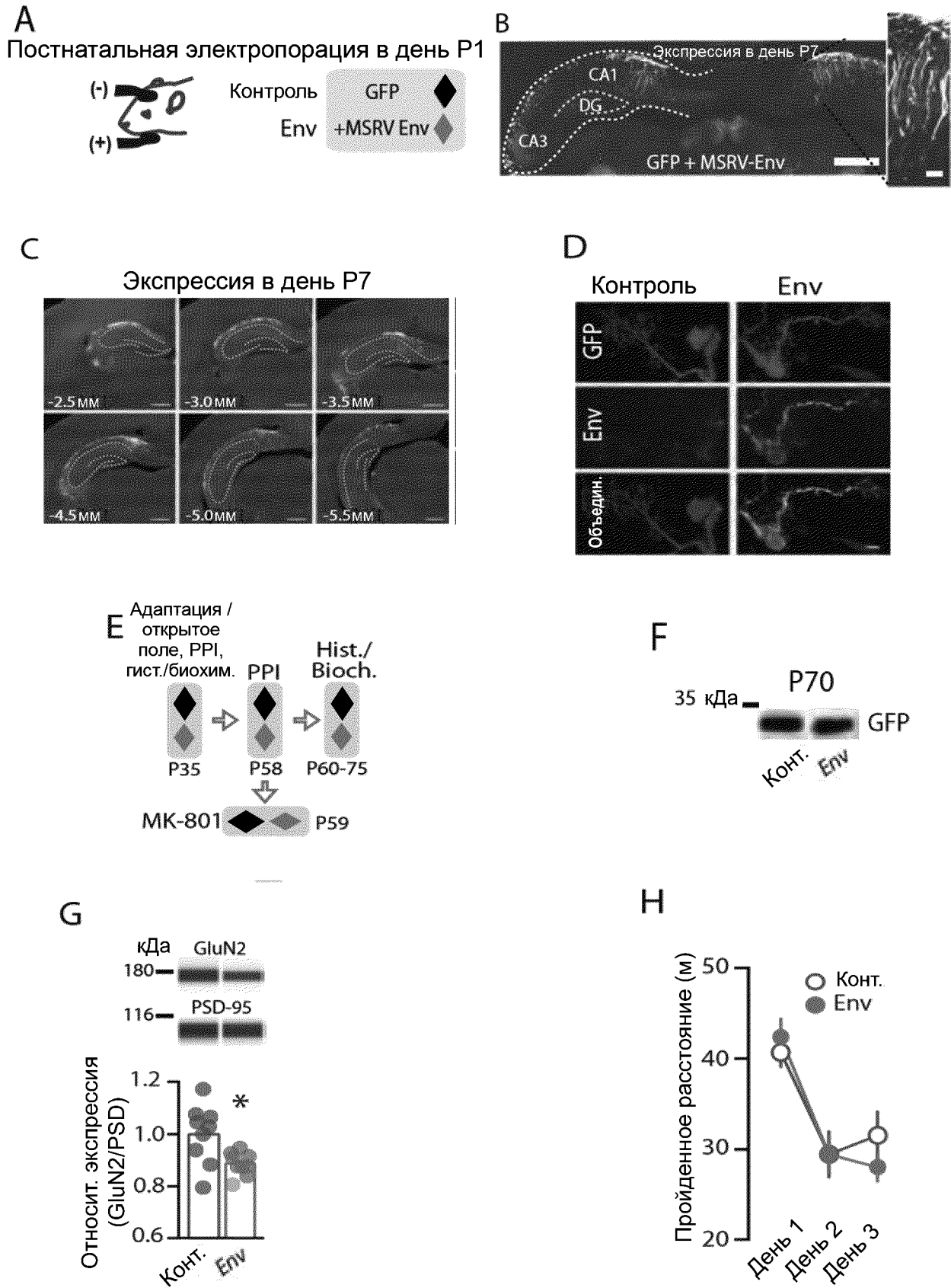
Фиг. 6



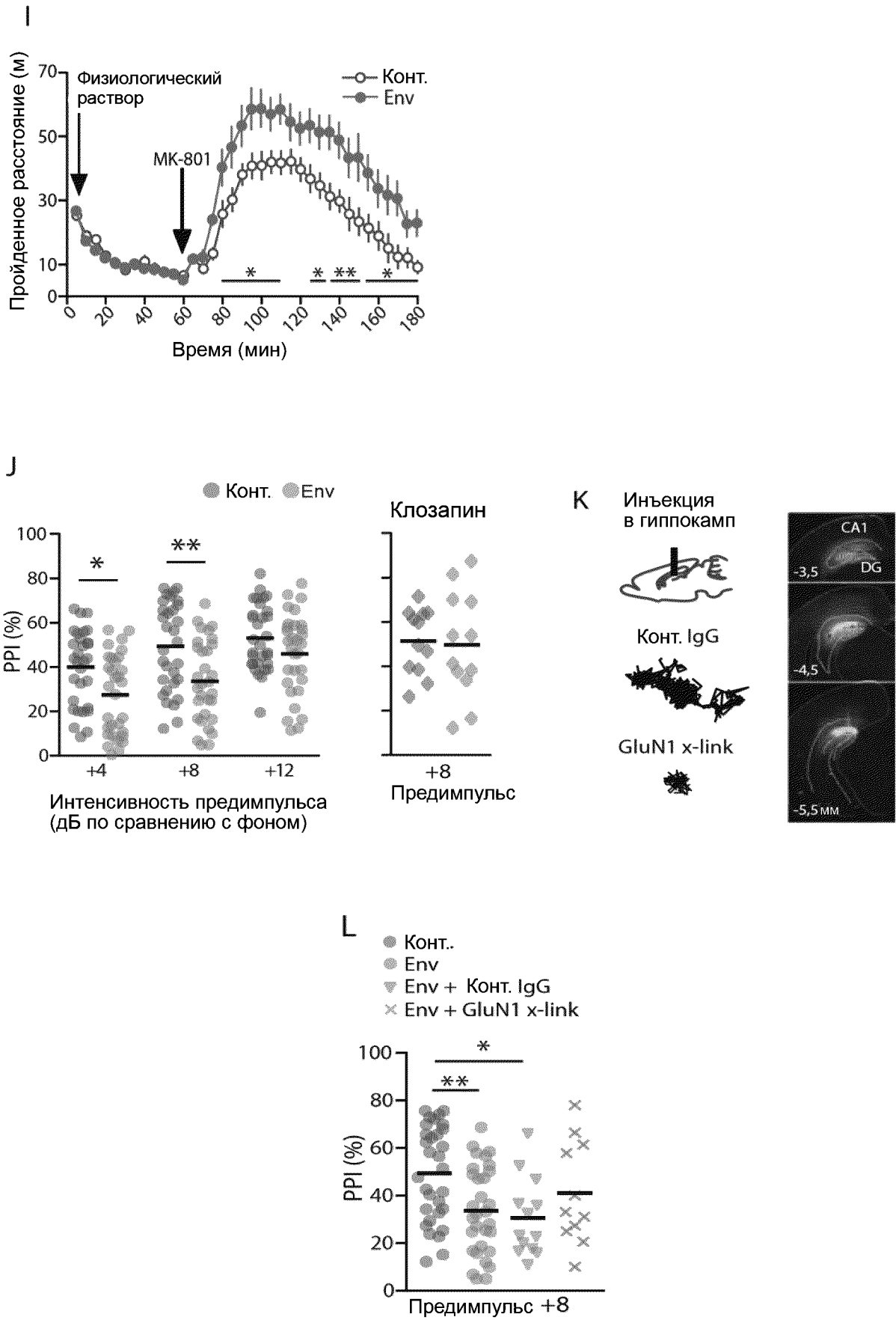
Фиг. 7



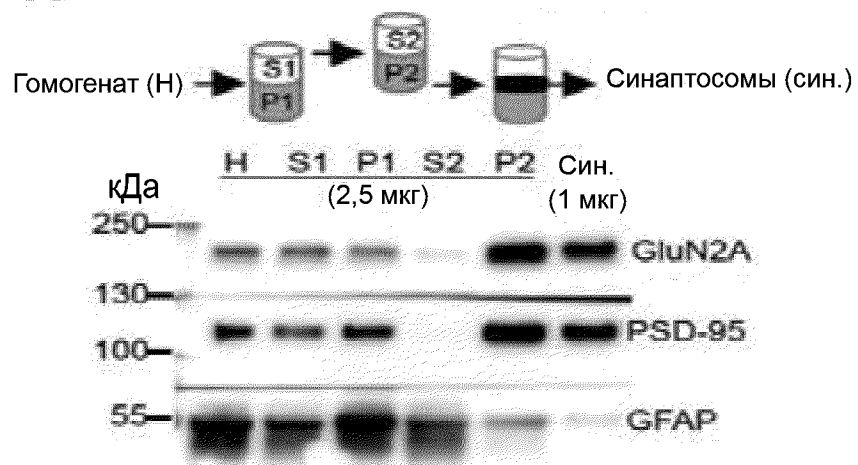
Фиг. 8



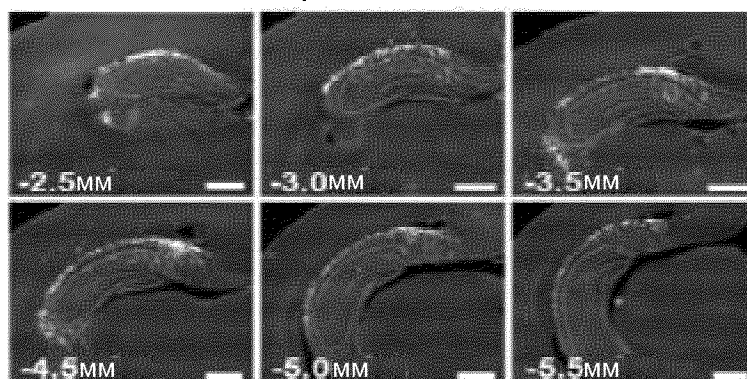
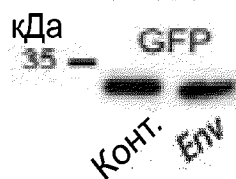
Фиг. 9



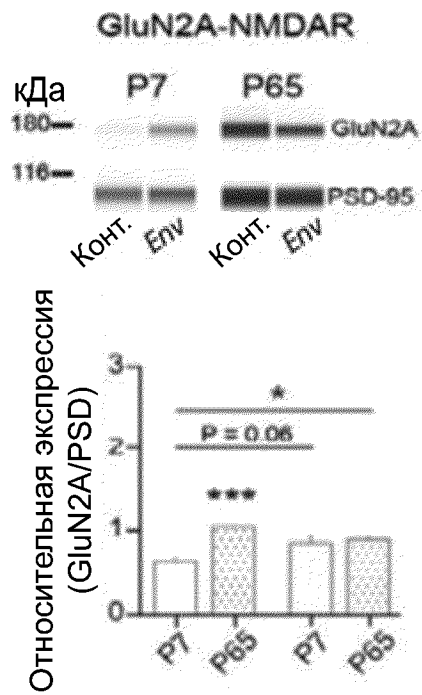
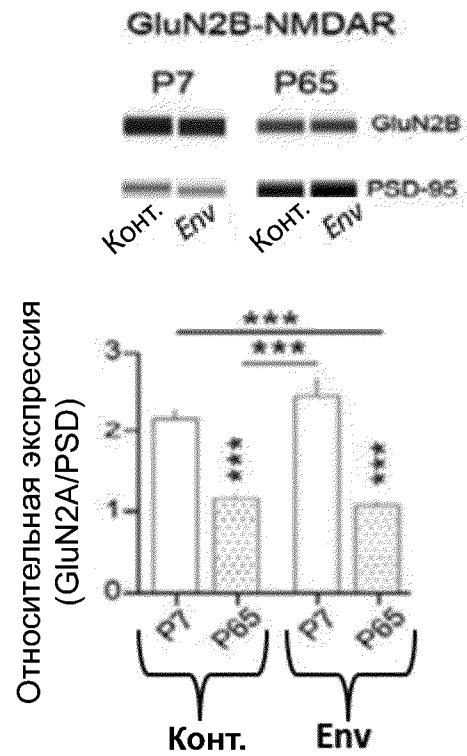
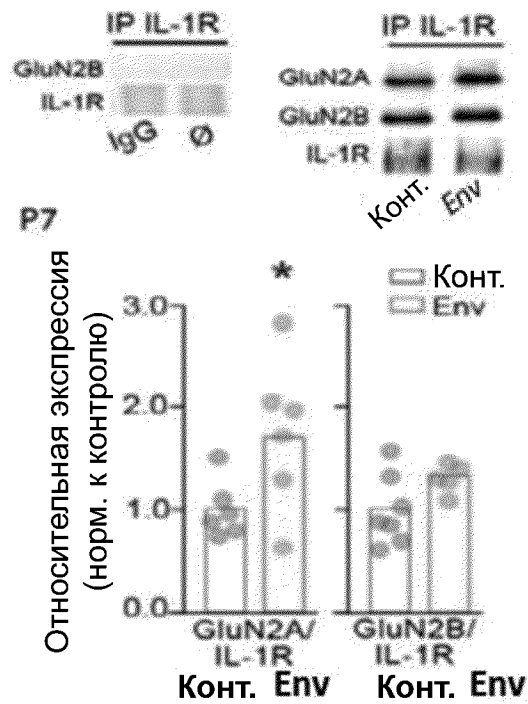
Фиг. 9 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

A**B**

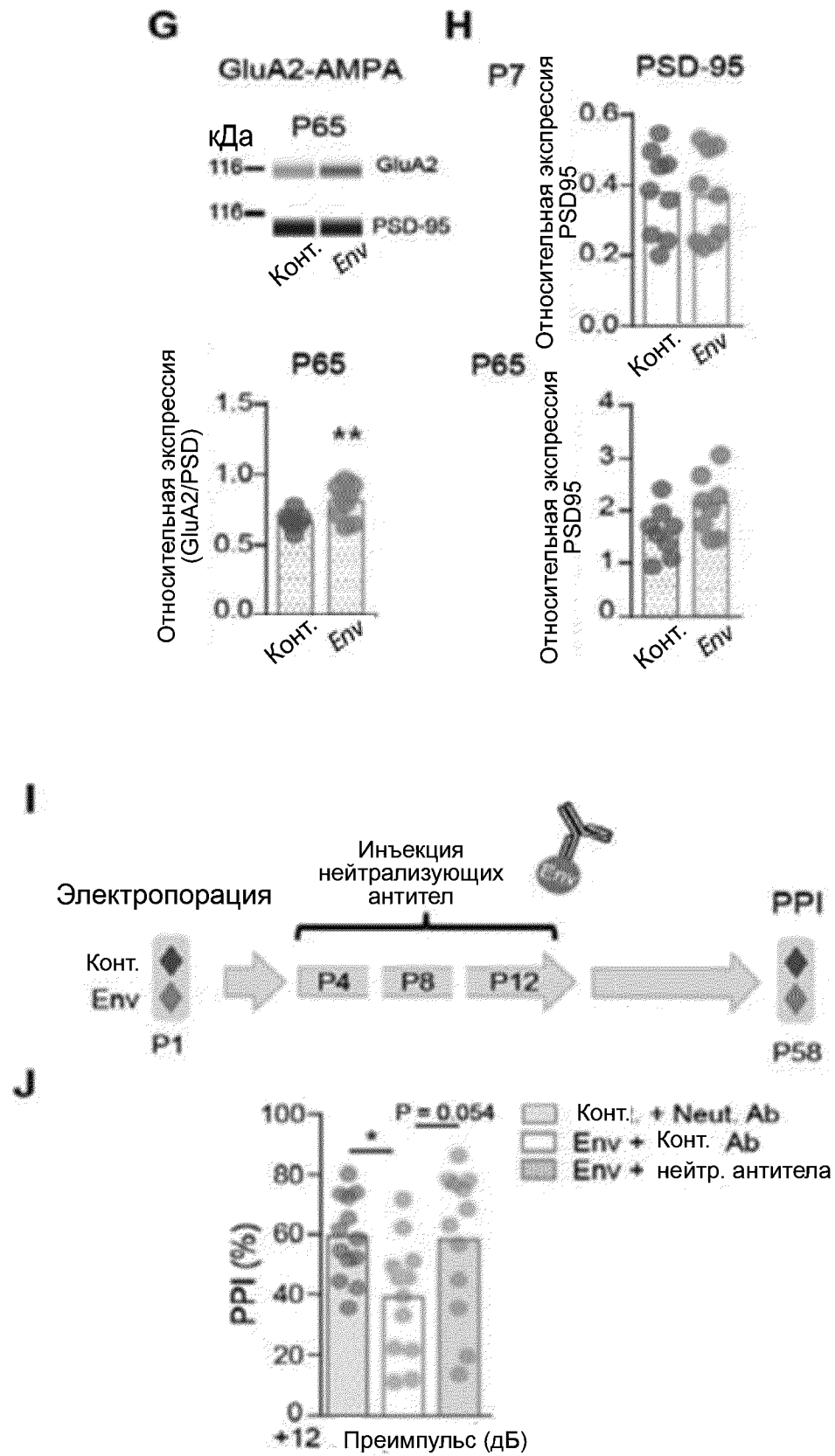
Экспрессия в день P7

**C**Экспрессия в
гиппокампе, P65

Фиг. 10

D**E****F**

Фиг. 10 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Фиг. 10 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

A

SEQ ID NO: 7

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DIYVTAQAFSPNYTLGTSASISCRSS	→	LYWFLQPGQSPQLLIY	→	QMS	→	QMLELFWT
		KSLIHSKGIITY		HLASGVDRFSSSGSGDTFTRISRVEAEDGVYVC		FGGGTKLEIK

三

CDR1

ER2

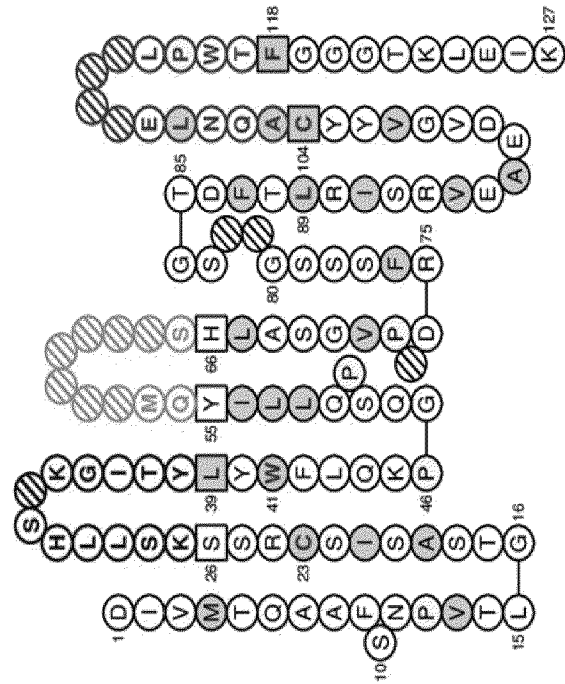
CDR2

ER3

CDR3

ER 4

Фиг. 11

B

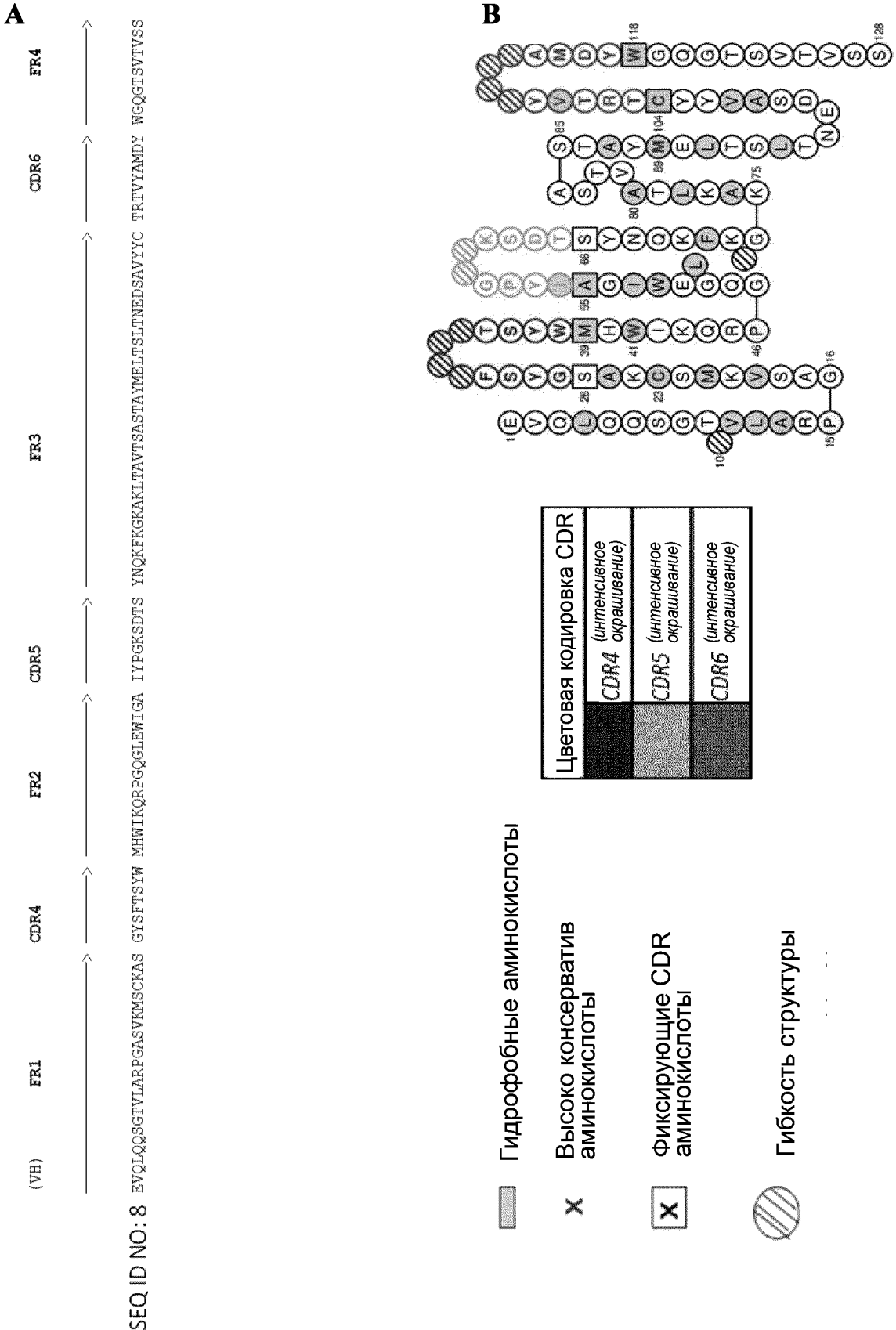
Цветовая кодировка CDR	
<i>CDR1</i>	(слабое окрашивание)
<i>CDR2</i>	(слабое окрашивание)
<i>CDR3</i>	(слабое окрашивание)

Гидрофобные аминокислоты

Высоко консерватив аминокислоты

фиксирующие CDR
аминокислоты

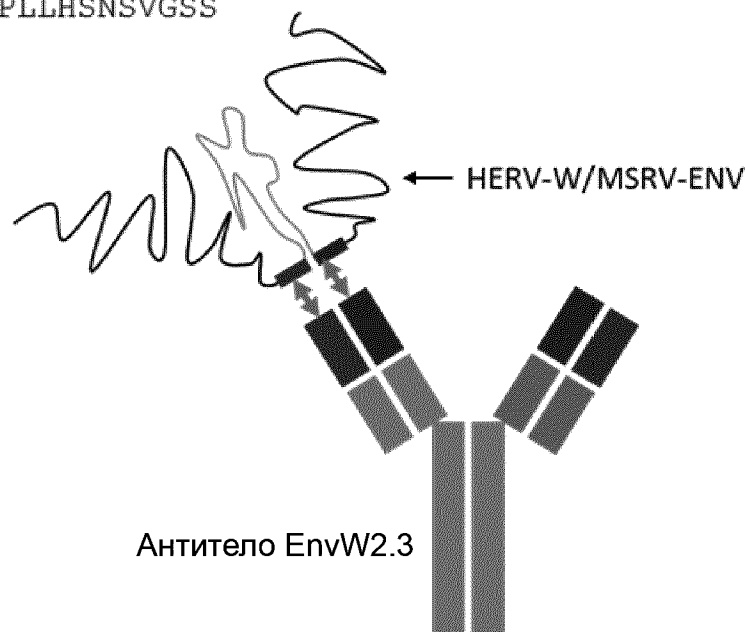
Гибкость структуры



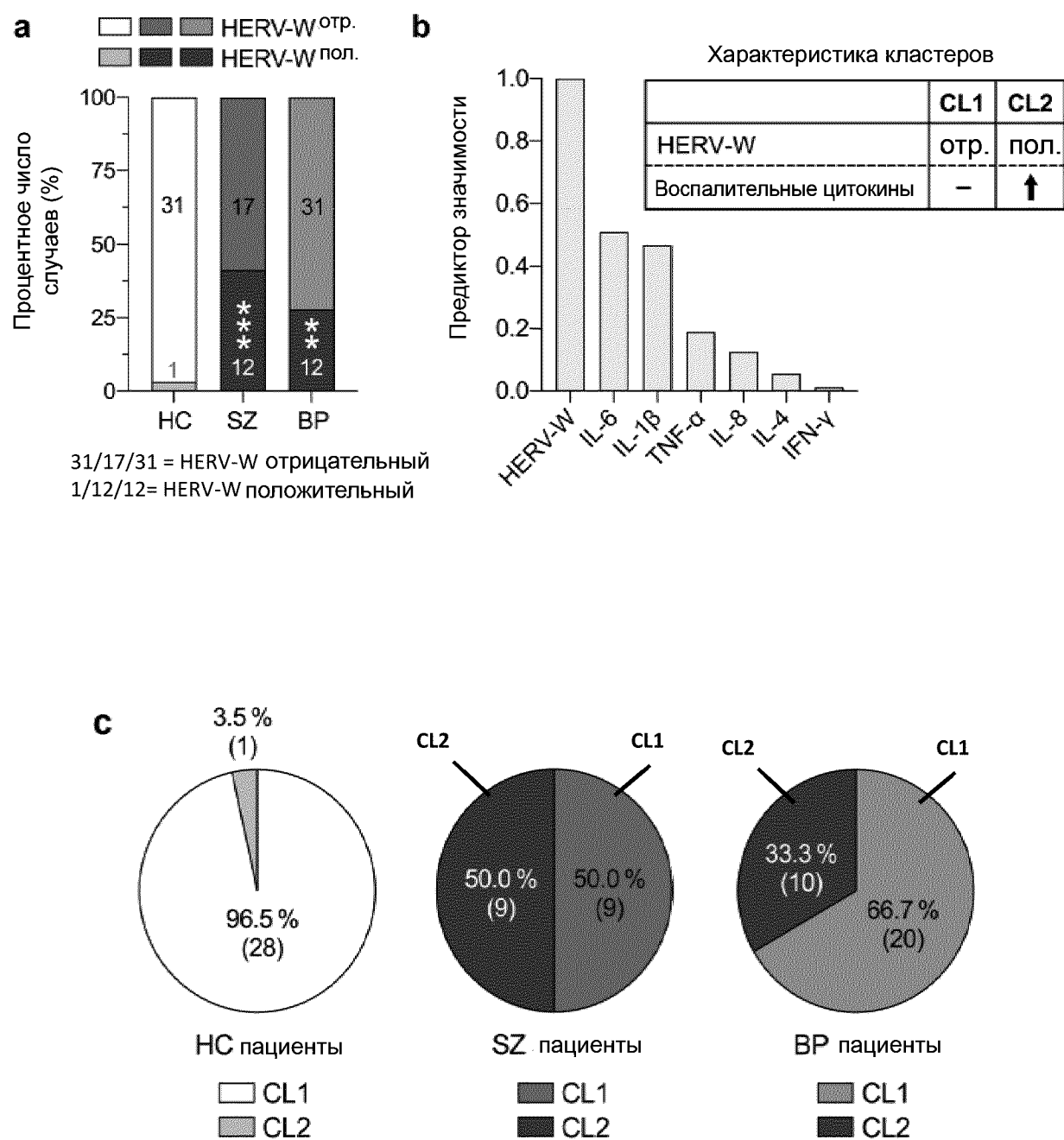
Фиг. 12

SEQ ID NO: 9

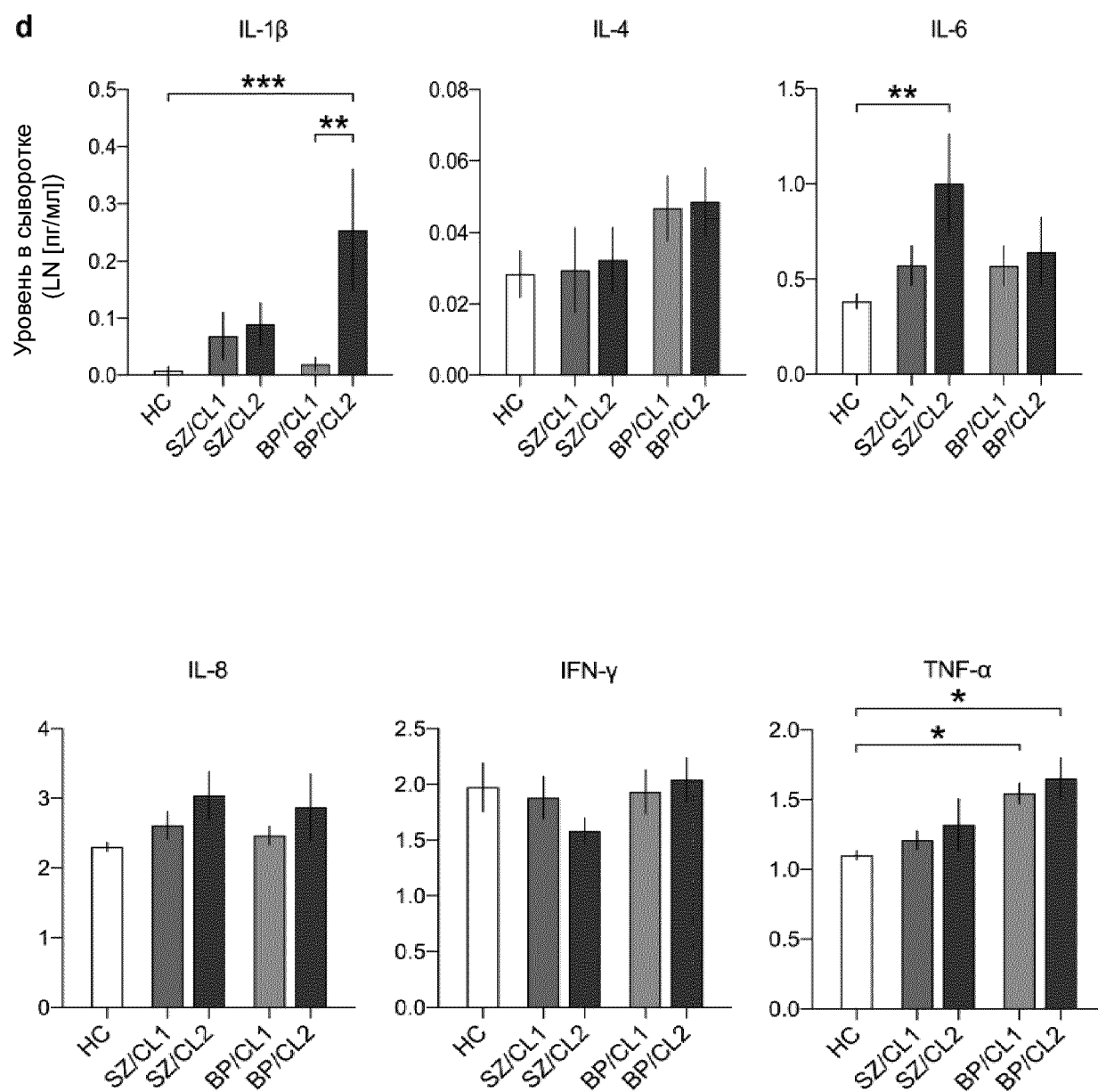
MALPYHTFLEFVLLPPFALTAPPPCCCTTSSSPYQEFLWRTRLPGNID
 APSYRSLSKGNSTFTAHTHMPRNCYNSATLCMHANTHYWTGKMINPSC
 PGGLGATVCWTFYFHTSMSDGGGIQGQAREKQVKEAISQLTRGHSTPS
 PYKGLVLSKLHETLRTHTRLVSLFNTTLTRLHEVSAQNPTNCWMCLPL
 HFRPYISIPVPEQWNNFSTEINTTSVLVGPLVSNLEITHTSNLT CVKF
 SNTIDTTSSOCIRWVTPPTRIVCLPSGIFFVCGTSAYHCLNGSSSESMC
 FLSFLVPPMTIYTEQDLYNHVVPKPHNKRVPILPFVIRAGVLGRLGTG
 IGSITTSTQFYYKLSQEINGDMEQVTDLSLVTLQDQLNSLA AVLQNR
 ALDLLTAKRGGTCLFLGEERCYYVNQSRIVTEKVKEIRDRIQCRAEEL
 QNTERWGLLSQWMPWTL PFLGPLAAIIFLLLEFGPCIFNFLVKFVSSRI
 EAVKLQIVLQMEPQM QSMTKIYRGPLDRPARLCSDVNDIEVTPPEEIS
 TAQPLLHSNSVGSS



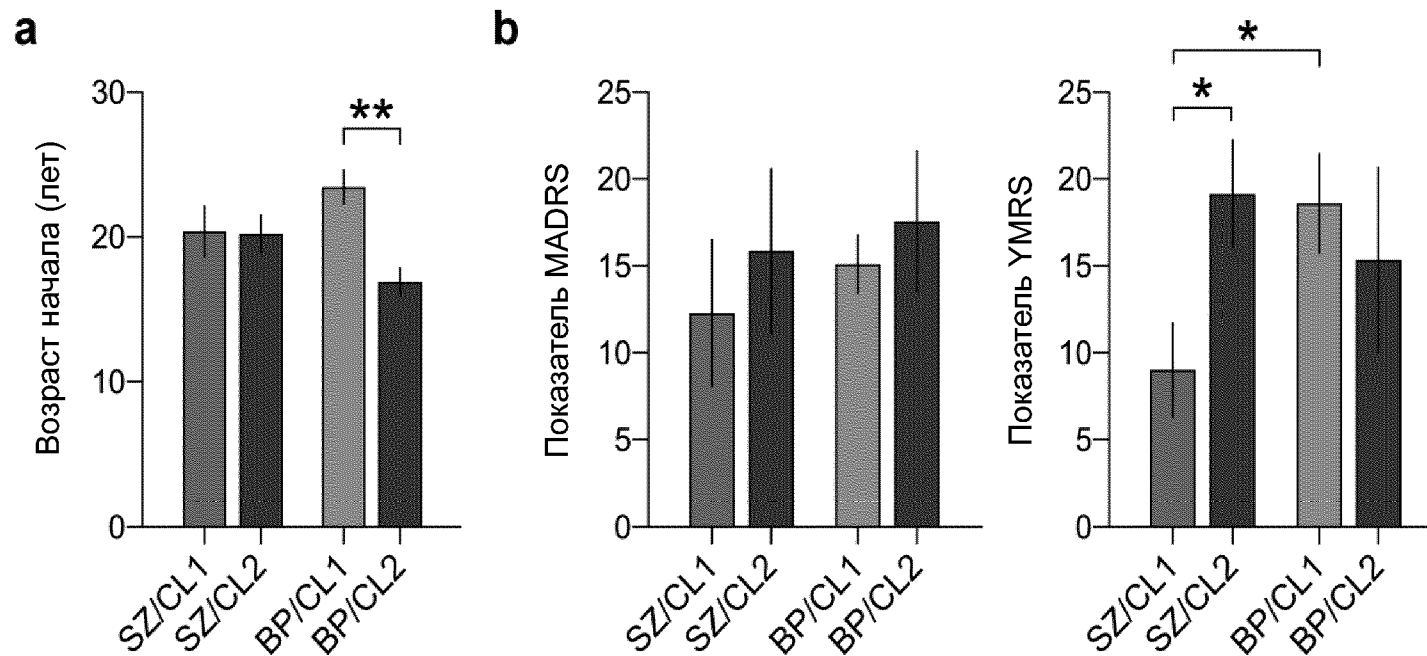
Фиг. 13



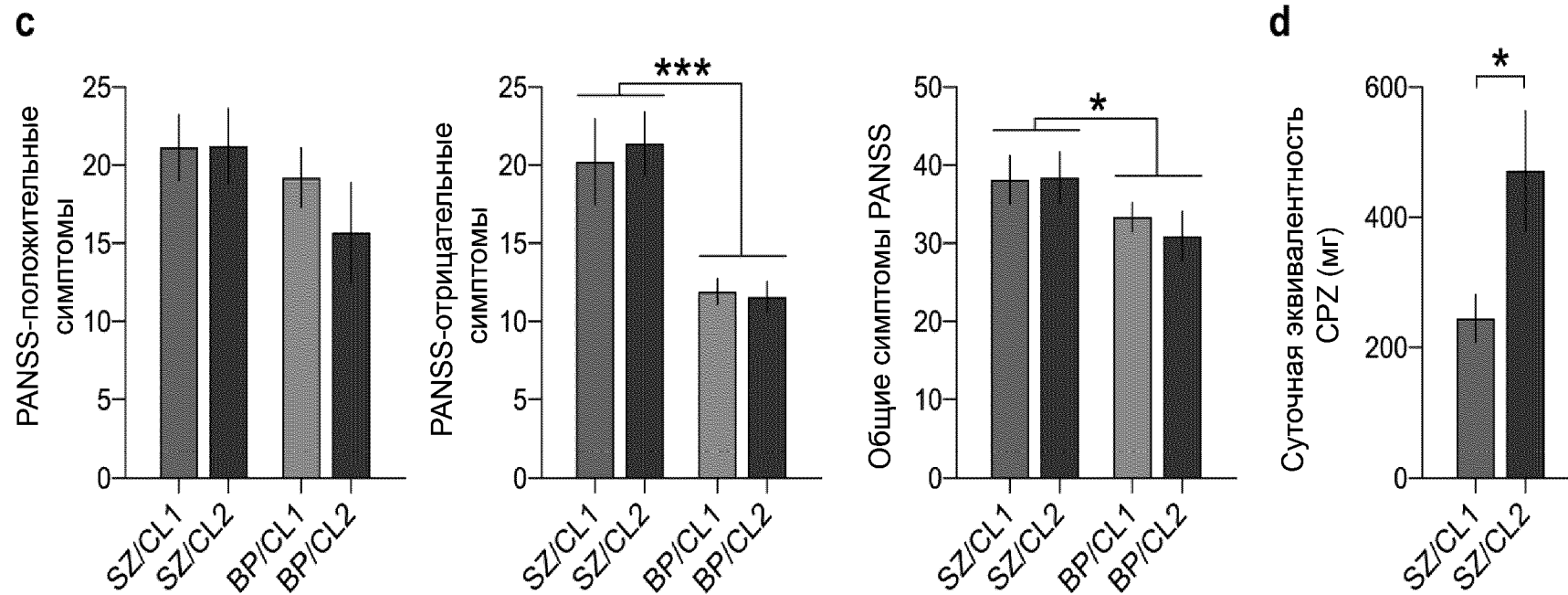
Фиг. 14



Фиг. 14 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Фиг. 15



Фиг. 15 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)