



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105495** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 1/18 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 25/00

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2011 01404**
(22) Дата подання заявки: **08.07.2009**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **26.05.2014**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/129 613, 61/202 581, 61/213 189**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **08.07.2008, 13.03.2009, 15.05.2009**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US, US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.05.2011, Бюл.№ 9**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **26.05.2014, Бюл.№ 10**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2009/058663, 08.07.2009**

(72) Винахідник(и):
**Бернард Корінне (FR),
Ланг Алоїс Бернхарт (CH),
Перрон Ерве (FR),
Бертранд Жан-Батіст (FR)**
(73) Власник(и):
**ДЖІНЕУРО СА,
18 chemin des Aulx, CH-1228 Plan-Les-
Ouates, Switzerland (CH)**
(74) Представник:
**Брагарник Олександр Миколайович,
реєстр. №326**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2005/080437 A, 01.09.2005
US 2003/185827 A1, 02.10.2003
WO 01/31021 A, 03.05.2001
EP 1 829 962 A, 05.09.2007
PERRON HERVE ET AL: "Monoclonal antibody against envelope protein from Human Endogenous Retrovirus "W" (MSRV-ENV or Syncytin) inhibits TLR4-initiated immunotoxicity cascade in human peripheral blood mononuclear cells and displays therapeutic effects in novel pre-clinical models for Multiple Sclerosis" JOURNAL OF NEUROVIROLOGY, vol. 13, no. Suppl. 1, 2007, pages 112-113
BLOND J-L ET AL: "ENVELOPE GLYCOPROTEIN OF THE HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUS HERV-W IS EXPRESSED IN THE HUMAN PLACENTA AND FUSES CELLS EXPRESSING THE TYPED MAMMALIAN RETROVIRUS RECEPTOR" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 74, no. 7, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 3321-3329

(54) ЛІГАНД, КОРИСНИЙ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ, ПОВ'ЯЗАНИХ З MSRV

(57) Реферат:

UA 105495 C2

Даний винахід належить до ліганду, що містить кожен з ділянок, які визначають комплементарність (CDR), представлених SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6, для лікування захворювань, пов'язаних з MSRV.

Об'єктом даного винаходу є ліганд, який у значній мірі зв'язується з молекулою-мішенню, антилігандом.

Згідно з даним винаходом "антилігандом" є білок MSRV-ENV (оболонковий), MSRV означає "ретровірус пов'язаний з розсіяним склерозом (PC)" (Perron, et al. (1997). "Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis". Proc Natl Acad Sci USA 94(14): 7583-8). Термін "білок MSRV-ENV" слід розуміти як повнорозмірний або частковий білковий продукт, який кодується генами MSRV env, як визначено в Komurian-Pradel, F, et al. (1999). Virology 260(1): 1-9, і Rolland A, et al. (2006) J Immunol 176(12): 7636-44, або будь-яку молекулу, яка імітує антигенні або зв'язуючі властивості MRSV-ENV (мімотоп). "ENV-T" відповідає повнорозмірному білку, який докладно описаний в прикладі 2 (залишки 1-542), а "ENV-SU", також відомий під назвою ENV-1, відповідає послідовності S30-K316, як показано в прикладі 2. ENV-SU також згадується в статті Rolland A, et al. (2006) J Immunol 176(12): 7636-44. Зазвичай для ретровірусів, MSRV проявляє варіабельність в оболонковому білку -ENV- (Perron, H. et al. (2000) J Neurovirol 6: S67-75; Voisset, C. O. Bouton et al. (2000) AIDS Res Hum Retroviruses 16(8): 731-40). Показано, що мімотопи, які імітують часткові білкові фрагменти MSRV ENV, існують і вибірково зв'язуються антитілами пацієнтів з розсіяним склерозом (Jolivet-Reynaud, C, H. Perron, et al. (1999). "Specificities of multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum antibodies against mimotopes". Clin Immunol 93(3): 283-93).

Конкретніше, ліганд згідно з даним винаходом містить кожен з ділянок, які визначають компліментарність (CDR), мають амінокислотні послідовності SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 і SEQ ID No. 6 або будь-яку послідовність, яка має:

- зазначену далі кількість заміщених амінокислот в межах вказаних послідовностей, і відомих як доцільні для одержання функціонально еквівалентних амінокислотних послідовностей (Huang 1986; Zabin, Horvath et al. 1991; Edgar and Schwartz 1992; Sardana, Emini et al. 1992; Xu, Kapfer et al. 1992; Lamande and Bateman 1993; Verdoliva, Ruvo et al. 1995; Yu, Schurr et al. 1995; Wehrmann, Van Vliet et al. 1996; Ullmann, Hauswald et al. 1997; Minuth, Kramer et al. 1998; Ullmann, Hauswald et al. 2000; Janke, Martin et al. 2003): від 0 до 3 в CDR1 (SEQ ID No. 1), від 0 до 2 в CDR2 (SEQ ID No. 2), від 0 до 2 в CDR3 (SEQ ID No. 3), від 0 до 1 в CDR4 (SEQ ID No. 4), від 0 до 4 в CDR5 (SEQ ID No. 5), від 0 до 2 в CDR6 (SEQ ID No. 6), або

- амінокислоти, заміщені іншими амінокислотами, які мають еквівалентні хімічні функції і властивості, добре відомі фахівцям в даній області (так званою "амінокислотою подібністю"), як вказано, наприклад, в приведеному нижче переліку подібних амінокислот (однолітерний код): G або A, F або Y, D або E, N або Q, K або R або H, S або T, C або M, V або L або I, W або P, і/або заміщені відомим з попереднього рівня техніки чином (Huang 1986; Zabin, Horvath et al. 1991; Edgar and Schwartz 1992; Sardana, Emini et al. 1992; Xu, Kapfer et al. 1992; Lamande and Bateman 1993; Verdoliva, Ruvo et al. 1995; Yu, Schurr et al. 1995; Wehrmann, Van Vliet et al. 1996; Ullmann, Hauswald et al. 1997; Minuth, Kramer et al. 1998; Ullmann, Hauswald et al. 2000; Janke, Martin et al. 2003) в межах вказаних послідовностей SEQ ID No.1 - SEQ ID No. 6.

Ці варіанти є результатом делецій, додавань або замінів амінокислот в пептидах SEQ ID No. 1 - 6 і, також охоплені даним винаходом, і можуть бути одержані способами, відомими в даній галузі техніки, такими як, наприклад, шляхом сайт-спрямованого мутагенезу або шляхом хімічного синтезу.

Ліганди згідно з даним винаходом мають здатність зв'язуватися з антилігандом згідно з даним винаходом.

Відповідно до даного винаходу під виразом "зв'язує" або "зв'язуючий" слід розуміти, що ліганд у значній мірі розпізнає антиліганд відповідно до критеріїв, приведених в прикладі 5.

У іншому аспекті винаходу вказаний ліганд включає варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), який містить ділянки, які визначають компліментарність (CDR), мають амінокислотні послідовності SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 і SEQ ID No. 3 або будь-яку послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична і, переважніше на 90% ідентична вказаним послідовностям, і варіабельну ділянку домена важкого ланцюга (VH), CDR, які мають амінокислотні послідовності SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 і SEQ ID No. 6 або будь-яку послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична і, переважно на 90% ідентична вказаним послідовностям.

У наступному аспекті ліганд згідно з даним винаходом включає варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), яка має амінокислотні послідовності, викладену в SEQ ID No. 7, або будь-яку послідовність, яка щонайменше на 75% ідентична і, переважніше на 80% і ще переважніше на 90% ідентична вказаній послідовності, і варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), який має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID No. 8, або будь-яку послідовність, яка

щонайменше на 75% ідентична і, переважніше на 80% і, ще переважніше на 90% ідентична вказаній послідовності.

Варіанти цих послідовностей VH і VL відповідно до даного винаходу у значній мірі зв'язуються з антилігандом.

5 "Ідентичність послідовності" означає, наприклад, що в послідовності, яка на 80% ідентична послідовності, 80% ідентичних амінокислот знаходяться в тому ж положенні при порівнянні послідовностей, що можна здійснювати відомими в даній галузі техніки способами, такими як описані в Sequence - Evolution - Function Computational Approaches in Comparative genomics. Koonon E. et al., 2003: Kluwer Academic Publishers, або відповідно до параметрів за умовчанням програмного забезпечення "Mac Vector" (UK).

10 Ліганд за даним винаходом може бути також визначений як включений в рекомбінантний білок scFv.

Відповідно до наступних аспектів винаходу ліганд може бути включений в Fab-фрагмент, в антитіло, яке може бути поліклональним, моноклональним, олігоклональним, химеризованим, сконструйованим або гуманізованим антитілом. У конкретному аспекті винаходу антитілом, яке включає ліганд, є IgG людини, і конкретніше IgG1 або IgG4.

Поліклональні, олігоклональні, моноклональні антитіла можуть бути одержані класичними способами, такими як описані Kohler and Milstein (1975), або використовуючи способи описані в Sambrook et al., A Guide to Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition (1989), використовуючи вищеописані антиліганди.

20 Конкретніше антиліганд за даним винаходом, який використовують для одержання антитіл, є антиліганд, який складається з SEQ ID No. 20 або з SEQ ID No. 32 або будь-якої послідовності, яка має щонайменше 75% ідентичності послідовностям, представленим в SEQ ID No. 20 або SEQ ID No. 32, або будь-якій послідовності, на 100% комплементарну їм.

25 Зокрема, у формі пептиду, пов'язаного з білком-носієм, таким як сироватковий альбумін або KLH, який зазвичай використовують для імунізації.

Винахід також відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить ліганд за винаходом як активний інгредієнт. Цей ліганд може бути також присутнім у фармацевтичній композиції у формі ScFv, Fab-фрагмента або антитіла.

30 Фармацевтичну композицію за винаходом застосовують для лікування MSRV-асоційованих захворювань.

В межах значення за даним винаходом "лікування" охоплює або профілактичне, або терапевтичне лікування.

35 Фармацевтичну композицію за даним винаходом вводять в кількостях, які будуть терапевтично ефективними і імуногенними і, як відомо в даній галузі техніки, дозування, яке вводять, залежить від індивідуума, який підлягає лікуванню.

У наступному аспекті винахід відноситься до способу лікування, який включає введення ліганду, ScFv, Fab-фрагменту або антитіла або ліганду в будь-якому молекулярному або відповідному терапевтичному векторі, який зберігає його єднальні властивості, як обговорено вище, або фармацевтичній композиції, як описано вище.

40 Спосіб лікування за винаходом направлений на лікування MSRV-асоційованих захворювань.

MSRV є ретровірусом людини, вперше виділеним у пацієнтів з розсіяним склерозом (Perron, H., B. Lalande, et al. (1991), Lancet 337(8745): 862-3; Perron, H., J. A. Garson, et al. (1997), Proc Natl Acad Sci USA 94(14): 7583-8). Асоційовані захворювання або синдроми визначають присутністю у відповідних пацієнтів або (i) специфічної РНК MSRV або антигенів, переважно виявлених в рідинах організму (крові, спинномозковій рідині, сечі), або (i) підвищеного числа копій ДНК або РНК в клітинах або тканинах органів з пошкодженнями або дисфункціями, або (i) специфічних білків або антигенів MSRV в клітинах або тканинах, залучених в процес захворювання або клінічного синдрому, або (i) білків або антигенів MSRV в рідинах організму індивідуумів із захворюванням або тих, в яких виражений клінічний синдром (як описано в прикладі 8, див. нижче, і в інших нижче). Оскільки MSRV має генетичну гомологію з сімейством ендегенних ретровірусів людини типу W (HERV-W) (Blond et al., 1999; Dolei, 2005; Dolei and Perron, 2008), альтернативне або додаткове визначення MSRV-асоційованих захворювань може бути також одержане з нуклеїновими кислотами, антигенами або білками HERV-W, використовуваними для таких же тестів на виявлення (Antony et al., 2004; Arru et al., 2007; Karlsson et al., 2004; Mameli et al., 2007). Крім того, експресія MSRV може бути зумовлена регуляцією деяких копій HERV-W, які спільно виявляються в патогенних пошкодженнях (Mameli et al., 2009). Таким чином, непряме визначення MSRV-асоційованих захворювань включає зв'язок з HERV-W елементами.

MSRV- асоційоване захворювання вибране з групи, яка включає розсіяний склероз, шизофренію, клінічно ізольований синдром (KIC, з неврологічним симптомом), хронічну запальну демієлінізуючу поліневропатію, епілепсію, псоріаз, рак, запальний панкреатит і діабет, такий як діабет типу 1 або типу 2, коли він пов'язаний із запаленням або порушенням імунної регуляції і з присутністю продуктів експресії MSRV, як визначено вище.

У конкретній формі здійснення способу лікування MSRV-асоційованих захворювань включає введення антитіла IgG4 або IgG1 як хронічне лікування ін'єкціями, які регулярно повторюються.

У іншому аспекті винахід відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, яка містить щонайменше одну повнорозмірну нуклеїново-кислотну послідовність, представлену в SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, або будь-яку послідовність, яка щонайменше на 70% і, переважніше на 80% і, ще переважніше на 90% ідентичні вказаним послідовностям, або будь-яку послідовність, на 100% комплементарну їм.

"Ідентичність послідовності" означає, наприклад, що в послідовності, яка має 80% ідентичності послідовності, 80% ідентичних нуклеотидів присутніх в тому ж положенні при вирівнюванні послідовностей, які можна здійснити відомими в даній галузі техніки способами (див. вище).

У переважному втіленні вищеописаного аспекту винаходу молекула нуклеїнової кислоти включає кожну з послідовностей, представлених SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 17 і SEQ ID No. 18, або будь-яку послідовність, яка щонайменше на 70% і, переважніше на 80% і, ще переважніше на 90% ідентичні вказаним послідовностям, або будь-яку послідовність, на 100% комплементарну їм.

У наступному аспекті нуклеїнова кислота кодує VH ланцюг, і конкретніше вона представлена SEQ ID No. 10 або 12, або будь-яку послідовність, яка щонайменше на 70% і, переважніше на 80% і, ще переважніше на 90% ідентичні вказаним послідовностям, або будь-яку послідовність, на 100% комплементарну їм, без обмеження вищеописаними відсотками заміни, інсерцій і делецій, які зберігають антигенні і зв'язуючі властивості початкових молекул ліганду або антиліганду (Huang 1986; Zabin, Horvath et al. 1991; Edgar and Schwartz 1992; Sardana, Emini et al. 1992; Xu, Kapfer et al. 1992; Lamande and Bateman 1993; Verdoliva, Ruvo et al. 1995; Yu, Schurr et al. 1995; Wehrmann, Van Vliet et al. 1996; Ullmann, Hauswald et al. 1997; Minuth, Kramer et al. 1998; Ullmann, Hauswald et al. 2000; Janke, Martin et al. 2003).

Нуклеїновокислотна послідовність може також кодувати VL ланцюг, який представлений послідовностями SEQ ID No. 9 або 11, або будь-яку послідовність, яка щонайменше на 70% і, переважніше на 80% і, ще переважніше на 90% ідентичні вказаним послідовностям, або будь-яку послідовність, на 100% комплементарну їм, без обмеження вищеописаними відсотками заміни, інсерцій і делецій, які зберігають антигенні і зв'язуючі властивості початкових молекул ліганду або антиліганду (Huang 1986; Zabin, Horvath et al. 1991; Edgar and Schwartz 1992; Sardana, Emini et al. 1992; Xu, Kapfer et al. 1992; Lamande and Bateman 1993; Verdoliva, Ruvo et al. 1995; Yu, Schurr et al. 1995; Wehrmann, Van Vliet et al. 1996; Ullmann, Hauswald et al. 1997; Minuth, Kramer et al. 1998; Ullmann, Hauswald et al. 2000; Janke, Martin et al. 2003).

Будь-які нуклеїнові кислоти, які гібридизуються в жорстких умовах з нуклеїновими кислотами, які кодують щонайменше один з пептидів відповідно до винаходу, також охоплені винаходом. Як використовується в даній заявці, термін "жорсткі умови" відноситься до умов, які дають можливість гібридизації між послідовностями зонду і нуклеотидною послідовністю, яку потрібно визначити. Відповідні жорсткі умови можуть бути визначені, наприклад, концентраціями солі або формаміду в розчинах прегібридизації і гібридизації, або температурою гібридизації, і добре відомі в даній галузі техніки. Зокрема, жорсткість можна підвищити шляхом зниженням концентрації солі, підвищенням концентрації формаміду або підвищенням температури гібридизації. Температурний інтервал, відповідний конкретному рівню жорсткості, може бути додатково звужений шляхом обчислення відношення пурину до піримідину, нуклеїнової кислоти, яка цікавить, і відповідного регулювання температури. Варіації вищеописаних інтервалів і умов добре відомі в даній галузі техніки.

Даний винахід також відноситься до химерного гену, який містить у функціональному зчепленні один з одним щонайменше один промотор, який є функціональним в організмі-господарі, нуклеїнову кислоту відповідно до винаходу і термінаторний елемент, який є функціональним в тому ж організмі-господарі. Різні елементи, які може містити химерний ген, є, по-перше, елементами, регулюючими транскрипцію, трансляцію і мацерація білків, таких як промотор, послідовність, що кодує сигнальний пептид або транзитний пептид, або термінальний елемент, представлений сигналом поліаденілування, і, по-друге, полінуклеотид, який кодує білок. Вираз "функціонально зв'язаний один з одним" означає, що вказані елементи химерного гену зчеплені один з одним таким чином, що на функцію одного з цих елементів впливає

функція іншого. Наприклад, промотор функціонально зчеплений з кодуючою послідовністю, коли він здатний впливати на експресію вказаної кодуючої послідовності. Конструювання химерного гену відповідно до винаходу і складання різних його елементів можна здійснити, використовуючи методики, добре відомі фахівцям в даній галузі техніки, зокрема, описані в
 5 Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Вибір регуляторних елементів, складових химерного гену, істотно залежить від організму-господаря, в якому вони повинні функціонувати, і фахівці в даній галузі техніки здатні вибрати регуляторні елементи, які є функціональними в даному організмі-господарі. Термін "функціональний" мають на увазі як маючий здатність функціонувати в
 10 даному організмі-господарі.

Промотори, які можуть містити химерний ген відповідно до винаходу, є або конститутивними, або індукцйбельними. Наприклад, універсально ефективним промотором, використовуваним для експресії в клітинах ссавців, є рCMV (цитомегаловірусний промотор).

Відповідно до винаходу химерний ген може також містити інші регуляторні послідовності, які
 15 розташовані між промотором і кодуючою послідовністю, такі як активатори транскрипції (енхансери).

Даний винахід також відноситься до клонуючого і/або експресійного вектору, який містить химерний ген відповідно до винаходу. Вектор відповідно до винаходу призначений для використання трансформації організму-господаря і експресії ліганду в цьому організмі. Цей
 20 вектор може бути плазмідною, космідною, бактеріофагом або вірусом. Переважно вектор трансформації відповідно до винаходу є плазмідною. Як правило, основними якостями цього вектора має бути здатність до самовідтворення та самореплікації в клітинах організму-господаря, зокрема, за рахунок наявності точки початку реплікації, і експресії в них ліганду. Для забезпечення стабільної трансформації організму-господаря вектор може також інтегруватися в
 25 геном. Тоді композиція вектора може бути обмежена елементами, потрібними для синтезу ліганду в господарях. Вибір такого вектора, а також методики вставки химерного гену відповідно до винаходу в цей вектор детально описані в Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) і загально відомими для фахівців в даній галузі техніки. Переважно вектор, використовуваний в даному
 30 винаході, також містить, додатково до химерного гена відповідно до винаходу, химерний ген, який кодує селективний маркер. Цей селективний маркер дає можливість відібрати організми-господарі, які ефективно трансформувалися, тобто ті, які включили вектор. Можна згадати гени, які легко кодують ідентифіковані ферменти, такі як фермент GUS, або гени, які кодують пігменти або ферменти, регулюючи продукування пігментів в трансформованих клітинах. Такі селективні
 35 маркерні гени, зокрема, описані в заявках на патенти WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 і WO 97/04103.

Даний винахід також відноситься до трансформованих організмів-господарів, які містять щонайменше один химерний ген відповідно до винаходу, або інтегрований в їх геном, або переносний на екстрахромосомному генетичному елементі, наприклад, на плазміді. Під
 40 терміном "організм-господар" мається на увазі будь-який нижчий або вищий одноклітинний або субклітинний організм, в який можна вводити химерний ген відповідно до винаходу з метою продукування ліганду відповідно до винаходу. Переважно організм-господар є клітинами СНО (яєчника китайського хом'яка) або НЕК (ниркового епітелію людини).

Виразом "трансформований організм-господар" мається на увазі організм-господар, який
 45 означає, включений, в його геном або в екстрахромосомний генетичний елемент, наприклад, плазмідну, щонайменше одного химерного гену відповідно до винаходу, і який, отже, продукує ліганд в своїх тканинах або в культуральному середовищі. Для одержання організмів-господарів відповідно до винаходу фахівці в даній галузі техніки можуть використовувати один з багатьох відомих способів трансформації.

Один з цих способів полягає в приведенні в контакт клітин або тканин організмів-господарів, які потрібно трансформувати, з поліетиленгліколем (ПЕГ) і з векторами відповідно до винаходу
 50 (Chang and Cohen, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 168(1), 111-115; Mercenier and Chassy, 1988, *Biochimie* 70(4), 503-517). Електропорація є іншим способом, який полягає в дії на клітини або тканини, які потрібно трансформувати, і вектори за винаходом електричного поля (Andreason and Evans, 1988, *Biotechniques* 6(7), 650-660; Shigekawa and Dower, 1989, *Aust. J. Biotechnol.* 3(1), 56-62). Інший спосіб полягає в прямій ін'єкції векторів в клітини або тканини шляхом мікроін'єкції
 55 (Gordon and Ruddle, 1985, *Gene* 33(2), 121-136). Переважно можна використовувати "біолістичний" спосіб. Він полягає в бомбардуванні клітин або тканин частками, на яких адсорбовані вектори за винаходом (Bruce et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(24), 9692-9696; Klein et al., 1992, *Biotechnology* 10(3), 286-291; U.S. Pat. No. 4,945,050).

Винахід також охоплює спосіб одержання ліганду, наприклад, ScFv, Fab фрагменту або антитіла, описаних вище, який включає стадію культивування клітини-господаря, описаної вище, в умовах, які дають можливість синтезу ліганду, Fab фрагменту або антитіла.

Ліганд за винаходом характеризується його зв'язуючими властивостями з антилігандом. У конкретній формі антиліганд за винаходом характеризується тим, що він складається з амінокислотної послідовності, визначеною SEQ ID No. 20, де переважний вибір представлений SEQ ID N°32.

Спосіб визначення антиліганду в біологічному зразку з використанням ліганду у формі ScFv, Fab фрагменту або антитіла відповідно до даного винаходу також складає частину даного винаходу. Цей спосіб включає стадії:

(а) приведення в контакт зразка з лігандом відповідно до винаходу, ScFv, Fab фрагментом або антитілом, як описано вище

(б) визначення присутності антиліганду в зразку.

Вказаний спосіб визначення може бути виконаний за допомогою додаткової стадії приведення в контакт зразку з лігандом, який специфічно зв'язується з антигеном MSRV GAG, кодований геном gag MSRV, як описано в Komurian-Pradel et al. *Virology*, 1999 ; 260(1), pages 1-9.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід також відноситься до набору для імунологічного аналізу на визначення антиліганду в біологічному зразку, який включає ліганд відповідно до винаходу, ScFv, Fab фрагмент або антитіло, як описано вище, і реагенти для виявлення специфічного скріплення антиліганду з вищеописаним лігандом, Fab фрагментом або антитілом, а також який включає всі реагенти, необхідні для імунологічної реакції.

Вказаний набір може додатково включати ліганд, який специфічно зв'язується з антигеном GAG, як визначено вище.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід також відноситься до застосування вказаного набору для імунологічного аналізу, як описано вище, при визначенні MSRV-асоційованого захворювання, вибраного з групи, яка включає розсіяний склероз, шизофренію, клінічно ізольований синдром, хронічну запальну демієлінізуючу поліневропатію, епілепсію, псоріаз, рак, запальний панкреатит і діабет, і конкретніше діабет типу 1 або діабет типу 2.

Біологічний зразок може бути сироваткою, сечею, слиною, матеріалом біопсії і тому подібним.

Схема імунологічних аналізів є загальноприйнятою в даній галузі техніки, і протоколи, такі як використання твердих носіїв або імуопреципітації, є добре відомими методами. Антитіло може бути міченим в цілях його виявлення з використанням ферментативних, флуоресцентних, хемілюмінесцентних, радіоактивних або фарбувальних міток. Аналізи, які ампліфікують сигнали від імунного комплексу, такі як аналізи з використанням біотину і авідину або стрептавідину, і імуноферментні аналізи, такі як ELISA або сендвіч-аналізи, складають частину даного винаходу.

Короткий опис графічних матеріалів

Фіг. 1: (A) амінокислотна послідовність VL, (B) амінокислотна послідовність VH, послідовності CDR підкреслені

Фіг. 2: структура повнорозмірного білка ENV (ENV-T) і фрагмент розщеплювання зовнішнього покриття (ENV 1 або ENV-SU)

Фіг. 3: Вимір оптичної щільності за допомогою колориметрії з субстратом пероксидази, які зрівнюють ліганд, який є мишачим антитілом GNbAC1 (мишачий IgG1 perox), і рекомбінантним фрагментом ScFv з одним лігандом (ScFv VH+VL biot).

Концентрація покриваючого антитіла і ліганду кожного визначення складала 5 мкг/мкл кожного; розведення кон'югату стрептавідин-пероксидазу складало 1/2000.

Фіг. 4: Вимір оптичної щільності за допомогою колориметрії з субстратом пероксидази, яка порівнює ліганд, який є мишачим антитілом GNb AC1, і Fab зв'язуючим фрагментом з одним лігандом. Концентрація ліганду і IgG1 кожного визначення складала 10 мкг/мл + Jackson анти-Fab з пероксидазою або анти-IgG, розведеного при 1/250. Тестували різні концентрації ENV-T.

Фіг. 5: Тест GNbAC1 і химерних антитіл IgG1 і IgG4 відповідно до винаходу на серійному розведенні антигену ENV (ENV-T). Концентрація антитіл складала 1 міліграм/мл, а розведення другого міченого пероксидазою антитіла анти-IgG складала 1/250. Антитіло 2G5E12 є нерелевантним антитілом, яке не зв'язується з антигеном ENV, використовуване як негативний контроль.

Фіг. 6: Тест GNbAC1 і химерних конструкцій IgG1 і IgG4 на постійній концентрації антигену (ENV-T) на двох партіях лігандів (A) партія 1, (B) партія 2. Концентрація антигену складала від 1 до 0,0078 початкового мишачого моноклонального антитіла (GNbAC1), вказаного як mIgG,

конструкцій IgG1 або IgG4 людини з лігандом (вказаних як hulgG1 і hulgG4), мкг/мл. Розведення другого антитіла Jackson IGG проти миші або проти людини складало 1/250.

Фіг. 7: GNbAC1, ScFv, химерні конструкції антитіла людини IgG1 і IgG4 з лігандом: інгібування протизапальної активації МКПК антигеном ENV (ENV SU), яке представлено зниженням IL-6. Співвідношення між антитілом або ScFv і антигеном ENV складало 25/1.

Фіг. 8: Результати АроН-ELISA. Сироватки з європейського багатоцентрового дослідження по розсіяному склерозу тестували всліпу в незалежній лабораторії.

Фіг. 9: Антігенемія MSRV-ENV і GAG у пацієнтів з шизофренією і в контролях. Використані антитіла 2A12A5 і 6A2B2 для ENV і 2G5E12 для GAG.

Фіг. 10: Оптична щільність (OD) АроН-ELISA на визначення антигену MSRV-ENV специфічним моноклональним антитілом 6A2B2.

Фіг. 11: Клінічне спостереження гуманізованих мишей SCID, у яких розвивається гостре нервово запалення і демієлінізація (експериментальний алергічний енцефаломієліт, модель розсіяного склерозу на тваринах): порівняння клінічного результату груп, оброблених різними антитілами, в порівнянні з необробленими групами. Початкове мишаче моноклональне антитіло (GNb AC1) вказане як mulgG, конструкції IgG1 або IgG4 людини з лігандом вказані як hulgG1 і hulgG4.

Фіг. 12: Криві гуманізованих мишей, які виживають SCID, і в яких розвивається гостре нервово запалення і демієлінізація (експериментальний алергічний енцефаломієліт, модель розсіяного склерозу на тваринах): порівняння клінічного результату груп, оброблених різними антитілами, в порівнянні з необробленими групами. Початкове мишаче моноклональне антитіло (GNb AC1) вказане як mulgG, конструкції IgG1 або IgG4 людини з лігандом вказані як hulgG1 і hulgG4.

Фіг. 13: Криві маси тіла кожної миші NOD-SCID, яка тестується в попередньому експерименті.

Доза білку ENV, ін'єктованого кожній миші, вказана в дужках. Остання ін'єкція білка ENV, емульгованого в IFA і PTX (P14), вказана стрілкою. Мишей позначили як M1 - M6, відповідно до дози ENV, яку вони отримали, що вказане після коду між дужками (від 0 до 20 мікрограмів) в графічній легенді. Переривання кривих відповідає добі загибелі тварини у відповідній категорії.

Фіг. 14: Концентрації глюкози в крові (глікемія) в контрольних (контроль) і ENV-ін'єктованих мишей NOD-SCID (ENV): порівняння між добами першої ін'єкції (P0) і одним тижнем після останньої ін'єкції (P30). Глікемія, зміряна на P30, виражена у вигляді відсотка від виміру на P0 (вісь Y), в ін'єктованих контролем і ENV- ін'єктованих групах (вісь X: - контроль і "ENV").

Фіг. 15: Визначення CDR важкого ланцюга антитіла GNb AC1.

15A: Амінокислоти, ідентифіковані відповідно до визначення по Чозіа, представлені буквами меншого розміру. Амінокислоти, ідентифіковані відповідно до визначення Kabat, представлені підкресленими буквами.

15B: Відповідно до переважного визначення, об'єднуючого обидва визначення, підкреслені початкові ділянки CDR миші, яких потрібно розглядати для щеплення функціонального ліганду на варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла IgG4 людини.

Фіг. 16: Визначення CDR легкого ланцюга антитіла GNb AC1. CDR, ідентифіковані відповідно до визначення по Кебету, підкреслені, CDR, ідентифіковані відповідно до визначення по Контакті (нестандартним), мають букви меншого розміру.

Фіг. 17: Зв'язуюча активність химерного антитіла GNb AC1 з імобілізованим білком ENV. Умови описані в тексті відповідного прикладу. На осі Y представлений вимір оптичної щільності (OD) для кожної крапки шляхом колориметрії і відповідність кількості антитіла, зв'язаного з білком-мішенню ENV. На осі X представлена концентрація рекомбінантного білку ENV, використаного для покриття відповідних лунок мікропланшету, і після відмивання отримують широкий кількісний спектр відповідного білка, імобілізованого на планшеті.

Фіг. 20: Порівняння єднальної активності гуманізованого антитіла H2A/K3 (H2vk3) і химерного антитіла (GNbAC1 Ig4) з імобілізованим ENV. Умови описані в тексті відповідного прикладу. На осі Y представлений вимір оптичної щільності (OD) для кожної крапки шляхом колориметрії й відповідність кількості антитіла, пов'язаного з білком-мішенню ENV. На осі X представлена концентрація рекомбінантного білку ENV, використаного для покриття відповідних лунок мікропланшету, і після відмивання одержують широкий кількісний спектр відповідного білка, імобілізованого на планшеті.

Фіг. 21: Очищене антитіло H2VK3 у гелі, який не відновлює. Умови описані в тексті відповідного прикладу. Ліворуч числа (кДа) вказують рівні (смуги), на які стандартні білки з певною молекулярною масою (кДа) мігрували в гелі, як показано на лівій доріжці зображення. Очищене антитіло H2A/K3 показано (стрілка) у вигляді однієї смуги на середній доріжці

зображення, де бичачий сироватковий альбумін (стандарт у буферах антитіла, як контроль, зазначеного стрілкою при різній молекулярній масі), показаний на правій доріжці зображення.

Фіг. 22: Порівняння єднальних активностей очищеного H2A/K3 (очищеного hH2+hVK3) і очищеного химерного антитіла (GNbAC1 Ig4) з іммобілізованим ENV (0,5 мкг/мл).

5 На осі X представлена концентрація химерного IgG4 або відібраного гуманізованого антитіла в нанограмах/мл. На осі Y представлена оптична щільність, обмірювана шляхом колориметрії, яка відповідає кількості антитіла, пов'язаного з іммобілізованим білком ENV постійної концентрації в аналізі.

10 Фіг. 23: Амінокислотні послідовності важкого ланцюга H2 і легкого ланцюга VK3 гуманізованого антитіла.

Амінокислоти в літерах напівжирним шрифтом підрядкового індексу являють собою мишачі амінокислоти, які містяться в каркасній області, на підставі їхнього консенсусу-положення з послідовностями людського антитіла, проаналізованими в базах даних.

15 Фіг. 24: Протизапальні цитокіни перетерплюють сильну підвищувальну регуляцію стимуляцією клітин-астроцитів білками, родинними HERV-W ENV. Результати представлені у вигляді середніх значень трьох повторів. ENV: MSRV-ENV; Сінцитин: HERV-W ENV з копії хромосоми 7q; X: Нерелевантне антитіло (контроль ізотипу); Мишаче анти-ENV: мишаче антитіло GNb AC1; Химерне анти-ENV: Химерний IgG4 людини й GNb AC1; пг/мл: пікограми на мілілітр.

20 Фіг. 25: Культури мононуклеарних клітин периферичної крові.

Результати представлені у вигляді середніх значень трьох повторів. ENV: MSRV-ENV; Сінцитин: HERV-W ENV з копії хромосоми 7q; X: Нерелевантне антитіло (контроль ізотипу); Мишаче анти-ENV: мишаче антитіло GNb AC1; Химерне анти-ENV: Химерний IgG4 людини й GNb AC1; пг/мл: пікограми на мілілітр.

25 Фіг. 26: Визначення глікозиліруваних білків, споріднених HERV-W ENV, людини із трьома формами ліганду GNb AC1 (мишаче, химерне й гуманізоване антитіло). А) Визначення глікозиліруваних білків, споріднених HERV-W ENV, людини з мишачим антитілом GNb AC1. Б): Визначення глікозиліруваних білків, споріднених HERV-W ENV, людини з химерним антитілом GNb AC1; В): Визначення глікозиліруваних білків, споріднених HERV-W ENV, людини з глікозиліруваним антитілом. Вісь Y: Оптична щільність; Вісь X: Бактеріальний білок MSRV-ENV (партія ENV-T 7A); Бактеріальний поверхневий фрагмент MSRV-ENV (партія ENV-SU 4A); глікозиліруваний сінцитин людини; глікозиліруваний білок MSRV-ENV людини (партія ENV-T P1).

Фіг. 27: Нейроповедінкове оцінювання пацієнтів, ін'єктованих інтрацеребрально MSRV ENV або контрольним розчином (контроль):

35 Горизонтальна - представлена числом пересічених ліній на осі Y- (A) і вертикальна - представлена підйомами на задні лабети на осі Y- (B) локомоторна активність після впливу винаходу в декількох моментах часу після інтрацеребральної ін'єкції пацієнтам (P5, P6, P7, P11 й P12) у контролі (розчин ФСБ - фосфатно-сольовий буфер), ENV-icv (ENV ін'єктовані інтрацеребральні шлуночки) і ENV-hipp (гіпокамп).

40 Фіг. 28: Нейроповедінкове оцінювання пацієнтів ін'єктованих інтрацеребрально MSRV ENV або контрольним розчином (контроль):

Горизонтальна - представлена числом пересічених ліній на осі Y- (A) і вертикальна - представлена підйомами на задні лапки на осі Y- (B) локомоторна активність після ін'єкції пацієнтам фізіологічного розчину в контролі, ENV-icv й ENV-hipp при P11.

45 Фіг. 29: Нейроповедінкове оцінювання пацієнтів, ін'єктованих інтрацеребрально MSRV ENV або контрольним розчином (контроль):

Горизонтальна - представлена числом пересічених ліній на осі Y- (A) і вертикальна - представлена підйомами на задні лапки на осі Y- (B) локомоторна активність після стресу обмеження контрольних, ENV-icv й ENV-hipp пацієнтів при P13.

50 Фіг. 30: Нейроповедінкове оцінювання пацієнтів, ін'єктованих інтрацеребрально MSRV ENV, яке показує терапевтичний ефект ліганду IgG4 GNbAC1:

(А) Горизонтальна локомоторна активність, обмірювана у відкритому полі, після впливу винаходу при P12 і при P32 - як показано на осі X- у контрольних пацієнтів, не оброблених пацієнтів, ін'єктованих ENV (ENV+), і IgG4-оброблених ENV+ пацієнтів, як зазначено в легенді

55 (В) Підтвердження терапевтичного ефекту ліганду IgG4, спостережуваного при P32 з горизонтальною локомоторною активністю після стресу обмеження; її вимірювали як число пересічених ліній на осі Y у відкритому полі після стресу обмеження після повторної системної ін'єкції білка ENV у контрольних пацієнтів, неопрацьованих пацієнтів ENV+ й IgG4-оброблених пацієнтів ENV+, як зазначено на осі X.

Фіг. 31: Дослідження "ENV-позитивних" безтимусних мишей із щепленою лімфомою, яка показує терапевтичний ефект ліганду IgG1 GNbAC1.

Селезінковий індекс (вісь Y), обчислений на контрольні й IgG1-оброблених мишах (вісь X) через 19 діб після ін'єкції клітин лімфоми. Селезінковий індекс обчислювали в такий спосіб:
5 [(маса селезінки/маса тіла) x 100]. Межі помилок, які не перекриваються, вказують на статистичну значимість.

Фіг. 32: Дослідження "ENV-позитивних" мишей SCID із щепленою лімфомою, яка показує терапевтичний ефект ліганду IgG1 GNbAC1

Співвідношення маси селезінки/тіла (вісь Y) обчислено на неопрацьованих й IgG1-оброблених мишах SCID через 7 діб після ін'єкції клітин В-лімфоми. Співвідношення маси селезінки/тіла обчислювали в такий спосіб: [(маса селезінки/маса тіла) x 100].
10

Фіг. 33: Дослідження "ENV-позитивних" мишей SCID із щепленою лімфомою, яка показує терапевтичний ефект ліганду IgG1 GNbAC1.

Число життєздатних і мертвих лімфобластоїдних клітин - вісь Y- (A), і інших лейкоцитів (B) у перитонеальній рідині, зібраної в контрольних й IgG1-оброблених мишей - вісь X -, через 7 діб після ін'єкції клітин лімфоми й через 6 діб після ін'єкції антитіла.
15

Наведені нижче приклади служать для ілюстрації винаходу без обмеження яким-небудь чином даного винаходу.

Приклади

20 Приклад 1: Аналіз мишачого специфічного антитіла (GNbAC1): ідентифікація послідовності й структури молекулярного ліганду, специфічного до білка MSRV ENV і його еквівалентам

Гібридому миші одержували після злиття міеломи миші й клітин селезінки від мишей Balb-C, імунізованих рекомбінантним білком MSRV, продукованим в *E. coli* й очищеним із клону MSRV "ENV", як описано в Komurian-Pradel, F., G. Paranhos-Baccala, et al. (1999), *Virology* 260(1): 1-9).

25 ПЦР ампліфікацію областей VH й VL з даної гібридоми, продукуючої IgG1/каппа (GNbAC1), проводили відповідно до наведеного нижче протоколу.

Полі(A+) РНК екстрагували й очищали з 5×10^7 клітини гібридоми, продукуючої IgG1/каппа, використовуючи набір для очищення мРНК (Amersham Bioscience) відповідно до інструкцій виробника. Зворотну транскрипцію проводили з 800 нг мрнк, використовуючи набір для ОТ-ПЦР (Amersham Bioscience) відповідно до інструкцій виробника. кДНК, яка кодує послідовності генів варіабельних областей легкого (VL) і важкого (VH) ланцюгів, одержували, використовуючи спосіб швидкої ампліфікації кінців кДНК (RACE), як описано раніше (Ruberti et al., 1994, *J. Immunol. Methods* 173, 33-39).
30

Прямий праймер являв собою наведену нижче послідовність SEQ ID No. 21 (RACEforward), зворотні праймери являли собою наведені нижче послідовності: SEQ ID No. 22 (CL_Ala130_Fwd) для VL ампліфікації й SEQ ID No. 23 (CH1_Pro119_Fwd) для VH ампліфікації, з буквеним кодом R = A/G, K = G/T, H = A/T/C. Зворотні праймери CL_Ala130_Backward й CH1_Pro119_Backward, виведені з консенсусів-послідовностей, опублікованих Kabat et al. (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. National Institute of Health Bethesda, MD), специфічні до N-кінців домену каппа/CL миші й домену IgG/CH1, відповідно.
40

Продукти ПЦР одержували, використовуючи Taq ДНК полімерази, і безпосередньо лігірували у векторі pCR®2.1-TOPO®, використовуючи набір для ТА клонування (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника. Послідовності клонованих ДНК визначали шляхом секвенірування на автоматичному секвенаторі ABI310, використовуючи набір Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems).
45

У результаті цих ПЦР ампліфікацій з наступними стадіями клонування й секвенірування одержали послідовності VL й VH ланцюгів, які представлені SEQ ID No. 7 й 8, відповідно, по їхніх амінокислотних послідовностях, виведеним з вихідних нуклеотидних послідовностей. Крім того, аналіз цих амінокислотних послідовностей дав можливість ідентифікації ділянок, які визначають комплементарність (CDR), залучених у специфічність ліганду (відповідно до Kabat (Wu and Kabat 1970, *An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity*. *J. Exp. Med.* 132:211-250; Kabat et al. 1987, 1991, *Sequences of proteins of immunological interest*; 4th edn. US Govt. Printing Off. No.165-492), або на підставі структури відповідно до Chothia (Chothia and Lesk 1987, *Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins*. *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al. 1989, *Conformations of immunoglobulin hypervariable regions*. *Nature* 342: 877-883).
50

Три послідовності CDR, ідентифіковані на амінокислотній послідовності VH (Фіг. 1 B), відповідають SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 й SEQ ID No. 6, і три послідовності CDR, ідентифіковані на амінокислотній послідовності VL (Фіг. 1 A), відповідають SEQ ID No. 1, SEQ ID
60 No. 2 й SEQ ID No. 3. Ці шість послідовностей CDR являють собою корові "мінімальні"

послідовності, які вимагаються для єднальної специфічності ліганду, і, отже, розглянуті в будь-якій композиції або молекулярній конструкції, яка зберігає активність даним ідентифікованого специфічного ліганду. Проте, фахівцям у даній галузі техніки відомо, що кілька амінокислот можуть бути замінені амінокислотами з еквівалентними властивостями, зберігаючи, таким чином, специфічність вихідних послідовностей ліганду й роблячи його еквівалентним лігандом. Такі варіації відомі як можливі в межах максимального діапазону 10-12%.

Приклад 2: Приклад одержання й очищення антигену MSRV ENV для імунізації мишей з метою одержання анти-ENV реактивних спленоцитів для утворення специфічних гібридом.

Джерело: плазмід р14 з віріону MSRV (Perron, Jouvin-Marche et al. 2001), яка містить білкову послідовність, яка відповідає номеру доступу бази даних (NCBI-Entrez/Genbank): AF331500.1.

На Фіг. 2 представлена структура повнорозмірного білку ENV (ENV-T, SEQ ID No. 19) і фрагмент поверхневого відщиплення (ENV 1 або ENV-SU, SEQ ID No. 24). На Фіг. 2 сигнальний пептид починається із залишку №1 (метіонин) і кінчається залишком №29 (треонин).

Спосіб одержання:

Після лігування послідовності, яка кодує, ENV-T, наданої Geneart (США), в експресійній плазміді, експресійному векторі pET-15b, який поставляє Novagen (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ, США), відповідно до інструкцій виробника й трансформації бактерій штаму BL21 E. coli шляхом класичної пермеабілізації CaCl_2 , як описано в "DNA Isolation and Sequencing" (Essential Techniques Series) by Bruce A. Roe, Judy S. Crabtree and Akbar S. Khan Published by John Wiley & Sons, ISBN 0-471-97324-0 QP625.N89R64 1996 John Wiley & Sons, і в "Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course (Paperback) by Katharine G. Field (Author), Walt Ream (Author), трансформовані бактерії вирощують у середовищі LB у присутності 30 мкг/мл канаміцину 37 °C до оптичної щільності.

Потім експресію білка індукували 1 мМ ІПТГ (ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид), і культивування продовжували при 37 °C протягом 4 годин.

Спосіб екстракції:

Після центрифугування при 5000 g протягом 20 хвилин при 4 °C бактеріальний осад ресуспендують в 20 мл/л культури лізіруючого буферу (Тріс 20 мМ р 7,5; NaCl 0,15 М; лейпептин 1 мкг/мл, пепстатин 1 мкг/мл, PMSF 1 мМ, MgCl_2 2 мМ, лізоцим 50 мкг/мл). Розчин інкубують протягом 30 хв при 4 °C при струшуванні, а потім обробляють ультразвуком на льоді/етанолі (4 стадії по 7 хв при 80% 0,5). Додають ДНКазу 1 мМ, і розчин інкубують одну годину при 4 °C при струшуванні. Суспензію центрифугують при 40000 g протягом 30 хв при 4 °C.

Осад ресуспендують в 7,5 мл/л культури солюбілізуючого буферу (Тріс 20 мМ р 7,5, NaCl 150 мМ, сечовина 2 М, ДСН 1,5%, β -меркаптоетанол 50 мМ). Розчин інкубують 2 години при 8 °C при струшуванні.

Потім суспензію центрифугують при 40000 g протягом 30 хв при 10 °C.

Спосіб очищення:

Надосадову рідину сечовини розводять в 5 разів у буфері Тріс 20 мМ р 7,5, NaCl 150 мМ, ДСН 1,5%.

Очищення проводять на 1 мл/л культури за допомогою афінної хроматографії на колонку Ni Sepharose Fast Flow (Amersham BioScience). Надосадову рідину наносять при 2 мл/хв на смолу після зрівноважування буфером Тріс 20 мМ, р 7,5, NaCl 150 мМ, сечовина 500 мМ, ДСН 1,5%, β -меркаптоетанол 10 мМ. Елюювання Env здійснюють східчасто 30 й 50 мМ імідазолу.

Очищення проводять знесолюючим стовпчиком (Amersham BioScience, 25 мл смоли). Пул після афінної хроматографії наносять при 2 мл/хв на смолу після зрівноважування буфером Тріс 20 мМ, р 7,5, NaCl 150 мМ, ДСН (додецилсульфат натрію) 1,5%, ДТТ 10 мМ. Білки елююють тим же буфером.

Після цього білки наносять при 1 мл/хв на стовпчик для гель-фільтрації Superdex 200 (Amersham Bioscience), урівноважену буфером Тріс 20 мМ р 7,5, NaCl 150 мМ, ДСН 1,5%, ДТТ (дітіотреїтол) 10 мМ. Білки елююють тим же буфером.

Видалення ендотоксинів:

Очищення проводять за допомогою стовпчика Acticlean (Amersham Bioscience, 8 мл смоли).

Пул наносять на смолу при 1 мл/хв після зрівноважування буфером Тріс 20 мМ р 7,5, NaCl 150 мМ, ДСН 1,5%, ДТТ 10 мМ. Білки елююють тим же буфером.

Контроль якості партії:

- Мас-спектрометрія MALDI-TOFF (відрізок часового спектру із іонізацією лазерною десорбцією з матриці): не можна використати у зв'язку із ДСН.

- N-Кінцеве секвенірування: ALPYXTFLFT

- Аналіз на ендотоксини: < 5 МЕ/мл

Характеристики партії:

Умове насичення розчину: 100%

Чистота: > 90%

5 Концентрація: 0,05 мг/мл

Зберігання: -80 °C

Кількість: 1,5 мг

Буфер: Тріс 20мм рН 7,5, NaCl 150 мм, ДСН 1,5%, ДТТ 10 мм

10 Приклад 3: Дані *in vitro* активності зв'язування ліганду, специфічного до антигену MSRV ENV I - Завдання

Автори винаходу оцінили спорідненість ліганду до рекомбінантного антиліганду у формі рекомбінантного білку ScFv із клонованих послідовностей VH+VL або у формі Fab-фрагменту, вищепленого з вихідного мишиного GNBAC1 (який має розщеплені ланцюги VH+VL без функції й структури мишиного антитіла), за допомогою імунологічного аналізу (ELISA). Цей ліганд порівнювали з вихідним мишачим GNBAC1 і з молекулярними конструкціями, які містять ліганд, вбудований у константні області ланцюгів IgG1 або IgG4 людини, і придатні послідовності для їхнього застосування як фармакологічні вектори.

II - Матеріал і способи

а) Клонування VH й VL:

20 Клонування й нуклеотидне секвенірування варіабельної області GNB AC1 легкого (VL) і важкого (VH) ланцюгів

Полі(А+)-РНК екстрагували й очищали з 5×10^7 клітин гібридами, продукуючої антитіло GNB AC1, використовуючи набір для очищення мРНК (Amersham Bioscience) відповідно до інструкцій виробника. Зворотну транскрипцію проводили з 800 нг мРНК, використовуючи набір для ОТ-ПЦР (Amersham Bioscience) відповідно до інструкцій виробника.

25 кДНК, яка кодує послідовності генів варіабельної області легкого (VL) і важкого (VH) ланцюгів, була отримана з використанням способу швидкої ампліфікації кінців кДНК (RACE), як описано раніше (Ruberti et al, 1994, The use of the RACE method to clone hybridoma cDNA when V region primers fail. J. Immunol. Methods 173, 33-39). Прямий праймер був наступним: RACE прямий (SEQ ID No. 21). Зворотні праймери були наступними: CL_Ala130_зворотний (SEQ ID No. 25) для ампліфікації VL й CH1_Pro119_зворотний (SEQ ID No. 26) для ампліфікації VH, з буквеним кодом R = A/G, K = G/T, H = A/T/C.

30 Зворотні праймери CL_Ala130_зворотний й CH1_Pro119_зворотний, виведені з консенсусів-послідовностей, опублікованих Kabat et al. (1991, Sequences of proteins of immunological interest. National Institute of Health Bethesda, MD), специфічні до N-кінців мишачого домену каппа/CL і домену IgG/CH1, відповідно.

35 Продукти ПЦР одержували, використовуючи Taq ДНК полімерази, і безпосередньо лігірували у вектор pCR®2.1-TOPO®, використовуючи набір для клонування TA (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника. Послідовності клонованих кДНК визначали шляхом секвенірування на автоматичному секвенаторі ABI310, використовуючи набір Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems).

б) Конструювання й експресія ScFv:

45 ScFV отримували відповідно до методів, описаними в Mallano A, et al. 2008, Generation and characterization of a human single-chain fragment variable (scFv) antibody against cytosine deaminase from Yeast. M. BMC Biotechnol. Sep 10; 8:68.

с) Fab з антитіла GNB AC1

Fab отримували відповідно до методів, описаними в Lefranc G, Lefranc MP. Antibody engineering and perspectives in therapy. Biochimie. 1990 Sep; 72(9): 639-51.

II-1 Матеріал

50 II-1a Моноклональні антитіла

Ліганд, молекулярні конструкції на основі IgG людини або GNBAC1, були одержані й очищені в наведених нижче концентраціях:

Таблиця 1

Концентрації різних лігандів, ScFv, Fab й антитіл

Назва	Концентрація
GNbAC1	5,91 мг/мл
Ліганд в IgG1 людини	1 мг/мл
Ліганд в IgG4 людини	2 мг/мл
Мишачий Fab	1 мг/мл
Рекомбінантний ScFv	1 мг/мл

II-1b Рекombинантні білки

Обидва рекомбінантних білка, повнорозмірний MSRV ENV (ENV-T) і фрагмент, який представляє собою поверхневий домен (ENV-SU), були одержані фірмою Protein Expert в E.coli і далі очищені, як описано в прикладі 2.

Таблиця 2

Концентрація рекомбінантних білків

Назва білка	Концентрація	Ендотоксин
ENV-T	0,15 мг/мл	<5 од/мл
ENV-SU	0,20 мг/мл	<5 од/мл

II-1c Сендвіч-аналіз ELISA

- 10 - Мікропланшети покривали 100 мкл на лунку іммобілізованого антитіла анти-ENV (3C1D5, який поставляє фірма bioMérieux), розведений в 50 мМ бікарбону натрію, рН 9,6. Планшети герметично закривали й інкубували протягом ночі при 4 °С.
- 15 - Мікропланшети промивали 3 рази 250 мкл на лунку ФСБТ 0,05% (фосфатно-сольового буфера з 0,05% Твін 20; Sigma P7949). Після останнього планшети перевертали й промокали на фільтрувальному папері для видалення якого-небудь залишкового буфера.
- 15 - Додавали 200 мкл ФСБТ 0,05% й 5% молока на лунку. Планшети герметично закривали й інкубували протягом 1 години при КТ при легкому струшуванні.
- 20 - Мікропланшети промивали 3 рази 250 мкл на лунку ФСБТ 0,05%. Після останнього планшети перевертали й промокали на фільтрувальному папері для видалення якого-небудь залишкового буфера.
- 20 - Мікропланшети інкубували з 100 мкл на лунку антигену ENV (ENV-T або ENV-SU), розведеного у ФСБТ 0,05%. Планшети герметично закривали й інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі при легкому струшуванні.
- 25 - Мікропланшети промивали 3 рази 250 мкл на лунку ФСБТ 0,05%. Після останнього планшети перевертали й промокали на фільтрувальному папері для видалення якого-небудь залишкового буфера.
- 25 - Додавали 100 мкл на лунку ідентифікуючого антитіла (GNbAC1 або рекомбінантного фрагмента ScFv), розведеного у ФСБТ 0,05%, і 5% молока. Планшети герметично закривали й інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі при легкому струшуванні. GNbAC1 було мічено пероксидазою, а ScFv було мічено біотином фірмою Squarix, Німеччина.
- 30 - Мікропланшети промивали 4 рази 250 мкл на лунку ФСБТ 0,05%. Після останнього планшети перевертали й промокали на фільтрувальному папері для видалення якого-небудь залишкового буфера.
- 30 - Додавали 100 мкл на лунку розчину субстрату (1 таблетка орто-фенілендіаміну (OPD), розведена в 10 мл 0,05 М фосфатно-цитратного буфера рН 5) і 10 мкл H₂O₂ 30% (приготованого в останній момент). Планшети інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі в темряві.
- 35 - Додавали 50 мкл на лунку розчину, який зупиняє 2 н . H₂SO₄.
- 35 - Поглинання зчитували при 490 нм у межах 30 хвилин після зупинки реакції.
- II-1d Прямий аналіз ELISA на мікропланшетах, покритих антигеном ENV (ENV-T або ENV-SU, як описано вище)

- Мікропланшети покривали 100 мкл/лунка антигену ENV, розведеного в 50 мМ бікарбонаті натрію, р 9,6. Планшети герметично закривали й інкубували протягом 2 годин при 37 °С при легкому струшуванні.

5 - Мікропланшети промивали 4 рази 250 мкл/лунка ФСБ (фосфатно-сольового буфера). Після останнього планшети перевертали й промокали на фільтрувальному папері для видалення якого-небудь залишкового буфера.

10 - Додавали 100 мкл/лунка ідентифікуючого антитіла відповідно до даного винаходу (GNbAC1 або його Fab-фрагмента), розведеного у ФСБ із БСА 1% (ФСБ із 1% бичачого сироваткового альбуміну). Планшети герметично закривали й інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі при легкому струшуванні.

- Мікропланшети промивали 4 рази 250 мкл/лунка ФСБ. Після останнього планшети перевертали й промокали на фільтрувальному папері для видалення якого-небудь залишкового буфера.

15 - Додавали 100 мкл/лунка другого ідентифікуючого антитіла, розведеного у ФСБ із БСА 1% (анти-Ig Jackson - розведення 1/250; або Ig проти миші, пероксидаза Jackson 115-035-146, або Ig проти миші пероксидаза Jackson 115-035-062, відповідно до першого антитіла). Планшети герметично закривали й інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі при легкому струшуванні.

20 - Мікропланшети промивали 6 разів 250 мкл/лунка ФСБ. Після останнього планшети перевертали й промокали на фільтрувальному папері для видалення якого-небудь залишкового буфера.

- Додавали 100 мкл на лунку розчину субстрату (1 таблетка орто-фенілєндіаміну (OPD), розведена в 10 мл 0,05 М фосфатно-цитратного буферу рН 5) і 10 мкл H₂O₂ 30% (приготованого в останній момент). Планшети інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі в темряві.

25 - Додавали 50 мкл на лунку розчину, який зупиняє, 2 н. H₂SO₄.

- Поглинання зчитували при 490 нм у межах 30 хвилин після зупинки реакції.

III - Результати

III-1 Сендвіч-аналіз ELISA: IgG1 миші (GNbAC1) і ScFv

Таблиця 3

Концентрації іммобілізованого антитіла проти ідентифікуючого ліганду з пероксидазою або біотином для кожної концентрації антигену або контрольного буфера. Результати відповідають обмірюваним оптичним щільностям.

	3C1D5 партія 060405CS02 Ig1GNbAC1 пероксидаза	3C1D5 партія 060405CS02 ScFv біотин
	Мічене	Мічене
Env SU 0,5 мкг/мол	2,695	1,289
Env SU 0,1 мкг/мол	1,036	0,656
Env SU 0,02 мкг/мол	0,294	0,455
ФСБТ 0,05%	0,101	0,411
Env T 0,5 мкг/мл	1,807	1,085
Env T 0,1 мкг/мл	0,862	0,594
Env T 0,02 мкг/мол	0,215	0,443
ФСБТ 0,05%	0,143	0,420

ФСБТ: фосфатно-сольовий буфер з 0,05% Твін 20

30

Результати аналізу ELISA, проведеного в паралелі з ScFv і вихідним GNbAC1, представлені при різних умовах на Фіг. 3.

Концентрація іммобілізованого антитіла й ідентифікуючого ліганду становила 5 мкл/мл для кожного; розведення кон'югату стрептавідін - пероксидазу становило 1/2000.

Автори винаходу аналізували GNbAC1 і рекомбінантне ScFv у якості ідентифікуючих лігандів у сендвіч-аналізі ELISA проти рекомбінантних білків ENV-SU й ENV-T. Як видно на Фіг. 3, при одній і тій же концентрації MAb й ScFv здатні ідентифікувати білки ENV при OD більше половини від IgG для ScFv, коли IgG є двовалентним, а ScFv є одновалентним. Отже, щодо

5

числа єднальних сайтів на молекулу, ізолюваний ліганд дав кращі результати, ніж повнорозмірний мишачий Ig. Таким чином, функції антитіла не є необхідними, і такі поліпшені результати для ізолюваного ліганду були несподіваними.

III-2 Прямий аналіз ELISA: GNbAC1 й Fab

Таблиця 4

Концентрації іммобілізованого антитіла проти мічених пероксидазою ідентифікуючих лігандів (пряме мічення) для кожної концентрації антигену або контрольного буферу. Результати відповідають обмірюваним оптичним щільностям. NA: Немає доступної міри (технічні несправності).

	Fab: 100 мкг/мол	GNbAC1:10 мкг/мол
Env T 0,5 мкг/мол	2,83	3,00
Env T 0,25 мкг/мол	1,85	2,75
Env 0,125 мкг/мол	1,19	8
Env T 0,0625 мкг/мол	0,77	NA
Env T 0,013125 мкг/мол	0,56	0,51
Env T 0,015625 мкг/мол	0,56	0,37
Env T 0,0078125 мкг/мол	0,48	0,26

10

Автори винаходу аналізували IgG1 миші і його Fab-фрагмент у якості ідентифікуючих лігандів у сендвіч-аналізі ELISA проти рекомбінантного білка ENV-T. Як видно на Фіг. 4, при одній і тій же концентрації одновалентний Fab ідентифікує білок ENV при оптичній щільності, більше високої або рівної двовалентному IgG. Знову ж, видно, що ізолюваний ліганд

15

несподівано дає кращі результати, ніж повнорозмірний IgG. Таким чином, можна зробити висновок, що повторно функції антитіла не були необхідними, і що ліганд сам більш ефективний, ніж природний IgG миші.

Приклад 4: Схема, конструювання й аналіз in vitro молекулярний конструкцій з константними ланцюгами IgG1 й IgG4 людини і лігандом

20

Після підтвердження несподівано поліпшених характеристик ізолюваного ліганду, який містить одновалентні єднальні сайти, або із природними (Fab), або з рекомбінантними (scFv) послідовностями VH й VL при ідентифікації антигену-мішені в імунологічному аналізі, автори винаходу розробили й сконструювали рекомбінантні послідовності для одержання химерних молекул IgG1 або IgG4 людини, які містять послідовності ліганду (VH+VL). Таким чином, автори

25

винаходу одержали повнорозмірні антитіла як молекулярні вектори для ліганду й оцінювали їх за допомогою імунологічних аналізів у порівнянні з вихідним мишачим IgG. З метою одержання цих рекомбінантних векторів антитіл з убудованим лігандом клони були адаптовані для їхньої експресії в клітинах CHO, і антитіла були одержані й очищені фірмою Polymun, Відень, Австрія. Технічні умови для одержання цих антитіл з відповідними векторами

30

підсумовані нижче:

Одержання рекомбінантних клітинних ліній CHO GNbAC1_IgG1 й GNbAC1_IgG4

У даному розділі описане джерело генів рекомбінантного моноклонального антитіла GNbAC1, яке експресує рекомбінантним шляхом у вигляді химерного IgG1 й IgG4 людини/миша, де константні області є людськими, а варіабельні області являють собою вихідні послідовності VH й VL, як описано в SEQ ID No.8 й SEQ ID No.7 відповідно.

35

Експресійні плазмідні

Химерні легкі ланцюги (LC) GNbAC1 Ig1

Базова експресійна плазмідна являє собою наявну в продажі pCIneo (Promega), яку використали на першій стадії для вставки оптимізованої по кодонах (оптимізація використання кодонів у клітинах CHO, розроблена фірмою GENEART, яка також включає оптимізацію структури мРНК) каркасної області легкого ланцюга каппа людини, яка включає секвеніровану сигнальну послідовність імуноглобуліну каппа, і константної області ланцюга каппа людини із проміжними сайтами рестрикції для вставки будь-якої варіабельної області легкого ланцюга. Відповідно до первинної послідовності VL (SEQ ID No.7) GENEART AG (Регенсбург, Німеччина)

45

була синтезована синтетична нуклеотидна вставка, яка включає сайти рестрикції в 3' кінці

сигнальної послідовності й 5' сайті області легкого ланцюга каппа, для вставки оптимізованої по кодонах варіабельної області VL (SEQ ID No.27) у відкритий BsiWI й AccIII еукаріотичний експресійний вектор, який несе оптимізовану по кодонах каркасну ділянку легкого ланцюга каппа людини - IgG1L кодони - під контролем промотору CMV. Крім того, вектор містить

5 неоміцинфосфотрансферазу для селекції клітин CHO з G418. SEQ ID No.28 указує нуклеотидну послідовність конструкції, яка зв'язує оптимізовані IgG1 L кодони й VL кодони, використовуваної для експресії в клітинах CHO.

Химерні важкі ланцюги (HC) GNbAC1 IgG1

Клонуючий вектор для створення еукаріотичного експресійного вектора GNbAC1 IgG1 складається із двох еукаріотичних експресійних касет з ідентичними регуляторними областями. Цей вектор уже містить оптимізовану по кодонах (оптимізація використання кодонів у клітинах CHO, розроблена фірмою GENEART, яка також включає оптимізацію структури мРНК) каркасну ділянку IgG1 людини, яка включає сигнальну послідовність важкого ланцюга імунoglobуліну й константну ділянку IgG1 людини із проміжними сайтами рестрикції для вставки будь-якої

15 варіабельної області важкого ланцюга.

Інформація з амінокислотної послідовності варіабельної області (VH) мишачого моноклонального антитіла GNbAC1 представлена в SEQ ID No. 8. Відповідно до цієї первинної послідовності GENEART була синтезована синтетична нуклеотидна вставка, яка включає сайти рестрикції (в 3' кінці сигнальної послідовності й в 5' сайті області CH1 гамма-ланцюга, для

20 вставки оптимізованої варіабельної області важкого ланцюга (SEQ ID No.29) - VH кодони - у відкритий по AgeI й NheI еукаріотичний експресійний вектор, який несе оптимізований по кодонах каркас IgG1 людини під контролем промотору SV40. Крім того, вектор містить дигідрофолатредуктазу миші в якості другої експресійної касети для використання як маркер селекції/ампліфікації в культурі клітин тварин. SEQ ID No.30 представляє нуклеотидну

25 послідовність конструкції, яка зв'язує оптимізовані кодони IgG1H-каркас людини й оптимізовані VH кодони, використовуваної для експресії в клітинах CHO.

Химерний важкий ланцюг (HC) GNbAC1 IgG4

Клонуючий вектор для створення еукаріотичного експресійного вектору GNbAC1 IgG4 складається із двох еукаріотичних експресійних касет з ідентичними регуляторними областями і є таким же, як для конструкції IgG1.

30

Однак, оскільки константна ділянка IgG4 людини була недоступна, повнорозмірний важкий ланцюг, який включає сигнальну послідовність, варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH) мишачого GNbAC1 і константну ділянку IgG4 людини були синтезовані фірмою GENEART.

SEQ ID No. 31 показує нуклеотидну послідовність кодуючої області химерної оптимізованої важкого ланцюга GNbAC1 IgG4 (IgG4H кодони). Потім вставку вбудовували у відкритий по NotI й SacII еукаріотичний експресійний вектор, одержуючи в результаті конструкцію, показану в SEQ ID No.32, яка зв'язує оптимізовані кодони IgG4H й оптимізовані кодони VH, використовувану для експресії в клітинах CHO.

35

Всі плазмідні були клоновані в GENEART, а потім трансформовані в штам E.coli TOP10. Рекомбінантні бактерії розмножували в 50 мл середовища LB/Amp, і плазмідні виділяли за допомогою набору Promega PureYield™ Plasmid Midiprep Systems. Вихід і чистоту плазмід контролювали фотометричним шляхом і по відношенню оптичної щільності при 260 нм й 280 нм, визначеному щонайменше як 1,5.

40

Одержання рекомбінантних клітинних ліній CHO GNbAC1_IgG1 й GNbAC1_IgG4

Методика трансфекції

45

Клітини яєчника китайського хом'ячка з дефіцитом по дигідрофолатредуктазу (названі CHO dhfr-, ATCC no. CRL 9096) були обрані в якості батьківської клітинної лінії для створення кінцевої експресійної лінії. Ці клітини, які мають походження з Американської Колекції Типових Культур (ATCC), розмножували в культивативному середовищі, яке складається з DMEM з додаванням 4 мм L-глутаміну, 0,1 мм гіпоксантину, 0,016 мм тимідину (HT), 0,25 г/л соєвого пептону, 0,1% Pluronic F-68 і вільної від білка добавки (Polymun Scientific) при відношенні розподілу 1:6 двічі в тиждень.

50

Для трансфекції використали 5×10^6 клітин, промитих один раз базовим середовищем і ресуспендованих в 10 мл повного середовища. Поліплекси утворили шляхом інкубації 900 мкл поліетиленіміну (1 мг/мл PEI лінійного, MW: 25000, Polysciences Inc.) з 12 мкг плазмід HC й 12 мкг плазмід LC у сумарному обсязі 2 мл протягом 30 хвилин при КТ. Взаємодія поліплексів із клітинами CHO в 12 мл тривало протягом чотирьох годин, після чого їх центрифугували при 170 g, відкидали надосадову рідину й ресуспендували клітини в культивативному середовищі. Через 24 повне середовище заміняли 50 мл селективного середовища, яке складається з DMEM з

60 додаванням 4 мм L-глутаміну, 0,25 г/л соєвого пептону, 0,1% Pluronic F-68, вільної від білка

добавки (Polymun Scientific) і 0,5 мкг/мл G418. Висівали 100 мкл клітинної суспензії на лунку в п'ять 96-ямкових планшетів. У результаті чотирьох експериментів по трансфекції (конструкцію "IgG1H кодони + VH кодони" котрансфікували з конструкцією "IgG1 L кодони + VL кодони" для химерного GNbAC1-IgG1; конструкцію "IgG4H кодони + VH кодони" котрансфікували з конструкцією "IgG1 L кодони + VL кодони" для химерного GNbAC1-IgG4) одержали сумарно 20х 96-ямкових планшетів (які відповідають 1920 лункам) на підтип IgG.

Після 10-14 діб в клони, які утворилися, додавали 100 мкл середовища ампліфікації, яке складається з 0,048 мкм MTX (метотрексату) у селективному середовищі. До зростаючих клонів знову додавали ще 100 мкл середовища ампліфікації, яке містить 0,048 мкм MTX, а потім аналізували в подвійному сендвіч-аналізі ELISA. В ELISA використали поліклональну сироватку, специфічну проти ланцюга гамма людини для іммобілізації й HRP-кон'югироване поліклональне антитіло проти ланцюга каппа людини для ідентифікації.

Відібрані клони з високим продукуванням адаптували до 0,19 мкм MTX у селективному середовищі.

У таблиці 5 описана селекція на кращі продуценти GNbAC1 IgG1 й GNbAC1 IgG4 при 0,096 й 0,19 мкм MTX у колбах Ру Т25 і ролерних судинах.

У випадку GNbAC1-IgG1 автори винаходу вибрали клон 6B6 й у випадку GNbAC1-IgG4 автори винаходу вибрали клон 7C1. У випадку GNbAC1-IgG1 провели кріоконсервацію трьох клонів, GNb AC1-IgG1_6B6, GNb AC1-IgG1_8H2 й GNbAC1-IgG1_18A8, і у випадку GNbAC1-IgG4 провели кріоконсервацію двох клонів, GNb AC1-IgG4_6C1 й GNb AC1-IgG4_7C1. Кращий клон був субклонований способом обмежуючих розведень, наприклад, описаним в "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition) Joseph Sambrook, Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Australia; David Russell, Cold Spring Harbour Laboratory Books".

Субклонування кращих продукуючих трансфектантів GNbAC1-IgG1_6B6 й GNbAC1-IgG4_7C1

Субклонування здійснювали в 96-ямкових планшетах з 90, 30 й 10 клітинами на лунку в середовищі ампліфікації, у випадку GNbAC1-IgG1_6B6: з 0,19 мкм метотрексатом (Sigma, MTX) і 50% надосадовою рідиною культури GNbAC1-IgG1_6B6, фільтрованої через 0,2 мкм; у випадку GNbAC1-IgG4_7C1: з 0,19 мкм MTX й 50% надосадовою рідиною культури GNbAC1-IgG4_7C1, фільтрованої через 0,2 мкм. Зростаючі лунки адаптували до 0,38 мкм MTX в 96-ямкових планшетах, аналізували за допомогою ELISA і розмножували в колбах Т25 для подальшого скринінгу й адаптації до 0,77 мкм MTX.

У таблиці 6 описана селекція на кращі субклони-продуценти GNbAC1 IgG1_6B6 й GNb AC1 IgG4_7C1 при 0,77 мкм MTX у колбах Ру Т25 і ролерних судинах.

Кращим продуцентом у випадку GNbAC1-IgG1_6B6 був клон GNbAC1-IgG1_6B6_10E4, а у випадку GNbAC1-IgG4_7C1 клон GNbAC1-IgG4_7C1_15B7. Ці два клони були обрані для подальшого розвитку клітинної лінії.

Провели кріоконсервацію двох клонів GNbAC1-IgG1: GNbAC1-IgG1_6B6_1D1, GNbAC1-IgG1_6B6_10E4 і двох клонів GNb AC1-IgG4: GNbAC1-IgG4_7C1_3E11, GNb AC1-IgG4_7C1_15B7.

Субклонування кращих субклонів-продуцентів GNbAC1-IgG1_6B6_10E4 й GNbAC1-IgG4_7C1_15B7.

Процедуру кінцевого субклонування знову проводили в 96 в 96-лункових планшетах з 90, 30 й 10 клітинами на лунку в середовищі ампліфікації, у випадку GNbAC1-IgG1_6B6_10E4 з 0,77 мкм MTX й 50% надосадовою рідиною культури GNbAC1-IgG1_6B6_10E4, фільтрованої через 0,2 мкм, у випадку GNbAC1-IgG4_7C1_15B7 з 0,77 мкм MTX й 50% надосадовою рідиною культури GNbAC1-IgG4_7C1_15B7, фільтрованої через 0,2 мкм. Зростаючі лунки аналізували за допомогою ELISA, кращі продуценти розмножували в колбах Т25 і ролерних колбах (Sp125) для подальшого скринінгу.

У таблиці 7 описана селекція на кращі продуценти субклонів GNbAC1 IgG1_6B6_10E4 й GNbAC1 IgG4_7C1_15B7 при 0,77 мкм MTX у колбах Ру Т25 і ролерних колбах.

У випадку GNbAC1-IgG1 проводили кріоконсервацію двох клонів GNbAC1-IgG1_6B6_10E4_18C7 й GNbAC1-IgG1_6B6_10E4_18D12, у випадку GNbAC1-IgG4 двох клонів GNbAC1-IgG4_7C1_15B7_3E4 й GNbAC1-IgG4_7C1_15B7_5G10 після ролерних культур.

MTX GNbAC1-Ig1:0,096 мкм MTX:

Таблиця 5

Лунки, відібрані після трансфекції й адаптації до різних рівнів

	рахунок кліток E+05 кл/мол	титр мкг/мл	доба	питомий титр пг/кл*доб [£]
B T25:	кл/мл			
6B6	6,9	14,2	4	5,2
8H2	5,6	4,0	3	2,3
18A8	3,8	3,3	3	2,9
BSp125:				
6B6	2,6	11,5	4	11,3
8H2	5,0	3,5	3	3,1
18A8	4,2	4,0	3	2,4

£: пікограми на клітину на добу.

Після адаптації до 0,19 мкм MTX:

	рахунок клітин E+05 кл кл/мол	титр мкг/мл	доба	питомий титр пг/кл*доб [£]
B T25:	кл/мл			
6B6	5,3	7,4	3	4,7
8H2	4,2	4,0	3	3,2
18A8	5,5	3,4	3	2,0

*: Пікограми/клітина

5

GNbAC1-IgG4:0,096 мкм MTX:

	рахунок клітин E+05 кл/мол	титр мкг/мл	доба	питомий титр [пг/кл*доб]
B T25:	кл/мл			
61C	4,1	9,6	3	7,9
7C1	2,3	3,7	3	5,4
B Sp125:				
6C1	5,5	14,3	3	8,6
7C1	4,5	10,9	3	8,2

Після адаптації до 0,19 мкм MTX:

10

	рахунок кліток E+05 кл/мол	титр мкг/мл	доба	питомий титр [пг/кл*доб]
B T25:	кл/мл			
6C1	3,6	11,8	3	10,8
7C1	4,7	12,5	3	8,8

Таблиця 6

Відібрані субклони після першого субклонування при 0,77 мкм MTX GNbAC1-IgG1:

	рахунок клітин E+05 кл/мол	титр мкг/мл	доба	питомий титр [пг/кл*доб]
B T25:	кл/мл			
GNbAC1-IgG1_6B6_1D1	4,8	23,4	4	12,1
GNbAC1-IgG1_6B6-10E4	3,4	11,9	3	11,8
B Sp125:				
GNbAC1-IgG1_6B6_1D1	4,0	12,9	3	10,8
GNbAC1-IgG1_6B6-10E4	3,5	10,9	3	10,4

GNbAC1-IgG4:

	рахунок кліток E+05 кл/мл	титр мкг/мл	доба	питомий титр [пг/кл*доб]
B T25:	кл/мл			
GNbAC1-IgG1_7C1_3E11	3,8	7,8	3	7,0
GNbAC1-IgG4_7C1_15B7	3,1	11,5	4	9,3
B Sp125:				
GNbAC1-IgG1_7C1_3E11	5,1	16,7	3	10,9
GNbAC1-IgG4_7C1_15B7	4,5	14,7	3	11,0

GNbAC1-IgG1:

Таблиця 7

Відібрані субклони після другого (кінцевого) субклонування при 0,77 мкм МТХ:

GNbAC1-IgG1_6B6_10 ^E 4_...:	рахунок клітин E+05 кл/мл	титр мкг/мл	доба	питомий титр [пг/кл*доб]
B T25:				
18C7	7,2	18,5	4	6,4
18D12	9,6	18,4	4	4,8
B Sp125:				
18C7 (160608)	4,1	21,6	4	13,3
18D12 (160608)	4,0	15,0	4	9,5
18C7 (190608)	6,2	20,9	3	11,3
18D12 (190608)	6,5	15,7	3	8,1
18C7 (230608)	4,7	20,9	4	11,1
18D12 (230608)	5,3	18,6	4	8,7
18C7 (260608)	2,7	11,2	3	13,8
18D12 (260608)	3,5	10,6	3	10,1

5

GNbAC1-Ig4:

GNbAC1-IgG4_7C1_15B7_...:	рахунок кліток E+05 кл/мл	титр мкг/мл	доба	питомий титр [пг/кл*доб]
B T25:				
3E4	4,1	25,6	4	15,6
5G10	5,2	30,5	4	14,8
B Sp125:				
3E4 (160608)	3,0	20,0	4	16,6
5G10(160608)	3,4	20,2	4	14,7
3E4 (190608)	4,3	20,9	3	16,2
5G10(190608)	4,2	23,2	3	18,5
3E4 (230608)	3,3	20,8	4	15,9
5G10(230608)	3,0	21,4	4	18,1
3E4 (260608)	2,5	16,7	3	22,1
5G10(260608)	2,6	16,4	3	21,3

Таким чином, були одержані рекомбінантні вектори антитіла IgG1 й IgG4 з убудованим лігандом, які відповідають шести послідовностям CDR, як описано в прикладі 1. Ці вектори, які містять шість CDR, аналізували в наступному прикладі, щоб визначити позитивний і негативний вплив векторів й, таким чином, запропонувати селекцію й/або адекватне застосування для кожного з них.

Приклад 5: Дослідження ліганда і його химерних конструкцій на основі IgG1 й IgG4 проти вихідного мишачого IgG1: спорідненість in vitro

Матеріали й методи були такими ж, як описано в прикладах 3 й 4.

5.a. ELISA з різними концентраціями повнорозмірного білку MSRV-ENV (ENV-T)

Таблиця 8: Оптичні щільності (OD) вимірювали за допомогою ELISA з різними лігандами (1 мікрограм) або нерелевантним контролем (2G5E12) на різних концентраціях (лівий стовпчик, у мікрограмах) антиліганду (ENV-T), нанесеного на лунки мікротитраційного планшету.

Зв'язування виявляють міченим пероксидазою антитілом анти-Ig (1/250; Jackson-USA) і взаємодією із субстратом пероксидази. Середнє значення всіх OD з нерелевантного контролю становить 0,1004, і їхнє стандартне відхилення (SD) становить 0,0205, отже, можна визначити граничне значення, нижче якого всі значення є неспецифічними при 99% довірчому інтервалі: середнє+3*SD = 0,1618. Всі представлені значення з конструкціями GNbAC1, отже, є значимими для специфічного зв'язування з білком-мішенню.

Таблиця 8

[ENV-T 7A]	GNbAC1 химерне IgG1 партія 2	GNbAC1 химерне IgG4 партія 2	GNbAC1 Мишаче 060413CS01	2G5E12 Мишаче 010227FP01
	3	3	2,998	0,082
0,5	3	2,889	2,899	0,12
0,25	2,891	2,524	2,837	0,093
0,125	2,393	1,985	2,285	0,111
0,0625	1,804	1,522	1,565	0,092
0,03125	1,562	1,367	1,341	0,066
0,0156	1,257	1,021	1,299	0,125
0,0078	0,815	0,692	0,625	0,114

Автори винаходу аналізували антитіло GNbAC1 і химерні варіанти IgG1 й IgG4 як ідентифікуючі антитіла в сендвіч-аналізі ELISA проти рекомбінантного білку ENV. Як видно на Фіг. 5 й у таблиці 8, при однаковій концентрації мишаче й химерне MAb здатні ідентифікувати присутні концентрації білків ENV при подібній кінетиці. Специфічність і відносна спорідненість нових конструкцій (ліганд у людському векторі), таким чином, зберігається й обидві конструкції, як з IgG1, так й IgG4 людини, з лігандом забезпечили людські химерні антитіла, здатні ідентифікувати пікограми рекомбінантного білка ENV. Це несподівано добре й підтверджує оптимізацію, досягнуту протягом всіх умов схеми, конструювання й експресії. Це також підтверджує селекцію стабільної й міцної структури ліганду, як описано в прикладі 1.

Крім того, даний досвід забезпечує засоби ідентифікації молекул, еквівалентних ліганду, за допомогою значимості їхнього зв'язування з вихідним антилігандом (ENV), як доведено тут з лігандом (GNbAC1) проти нерелевантного "неєднального" ліганду (2G5E12):

Антиген Env-T наносять на лунки мікротитраційного планшету ELISA із серійними розведеннями, які перебувають у діапазоні від 1 мкг/мл до приблизно 0,01 мкг/мл.

Стандартний ліганд (GNbAC1) і нерелевантний ліганд (2G5E12) тестують при 1 мкг/мл і виявляють другим антитілом (тут другим антитілом анти-IgG, міченим пероксидазою, від Jackson Ltd, США, розведеним 1/250, на яке тут далі посилаються як на IgG (H+L) проти миші Jackson або IgG проти людини Jackson, США).

Крива зі стандартним лігандом показує насичення сигналу (оптичну щільність, більш високу або рівну 3) при найвищій концентрації ENV і прогресивно знижується до оптичної щільності приблизно 1,0-0,5, що, таким чином, свідчить про криву дозу-відповідь, типову для специфічної єднальної активності (вище обчисленого статистичного граничного значення 0,1618; див. таблицю 8). Паралельно нерелевантна молекула (2G5E12) не показує криву доза-відповідь (середньо полого крива) і коливається між оптичною щільністю 0,1 й 0,05 при будь-якій концентрації ENV, нижче обчисленого статистичного граничного значення 0,1618 (таблиця 8).

Таким чином, про будь-яку молекулу, еквівалентну ліганду, може, свідчити або

1) Існування кривої доза-відповідь у даному тесті, в умовах даного прикладу, як показано в параграфі 5a, і

2) Відсутність пологої кривої, яка коливається нижче статистичного обчисленого порогу (середнє + три стандартних відхилення) значень оптичної щільності, отриманих з нерелевантним антитілом (див. 2G5E12 у таблиці 8), у порівнянні зі значеннями вище порога, отриманими зі стандартним GNbAC1 для концентрації ENV 0,01 мікрограма/мл (див. таблицю 8);

або

3) Існування кривої доза-відповідь у тесті, який описаний нижче, із серійними розведеннями ліганду й фіксованою концентрацією антиліганду, у параграфі 5b (таблиця 9), і

4) Відсутність пологої кривої, яка коливається нижче статистичного обчисленого порога (середнє + три стандартних відхилення) значень оптичної щільності, отриманих з нерелевантним антитілом (див. 2G5E12 у таблиці 9), у порівнянні зі значеннями вище порога,

отриманими з відповідним стандартом GNBAC1 при концентрації 0,01 мікрограма/мл, у тих же умовах, як описано в параграфі 5b (див. таблицю 9).

5b ELISA з різними концентраціями MAb

- Таблиця 9. Оптичні щільності, обмірювані за допомогою ELISA із серійними розведеннями ліганду й фіксованою концентрацією антиліганду (ENV-T; 0,01 мікрограма/мл), нанесеного на лунки мікротитраційного планшету. Зв'язування виявляють міченим пероксидазою антитілом анти-Ig G (1/250; Jackson-USA) і взаємодією із субстратом пероксидази.

Таблиця 9

Концентрація	GNBAC1 мишаче	IgG проти миші (H+L) Jackson 1/250				IgG проти людини Jackson 1/250		
		2G5E1 2	GNbAC1-Ig1	GNbAC1-Ig4	Контроль буфер	2G5E12	GNbAC1-IgG1	GNbAC1-IgC4
1	2,065	0,077	0,738	0,753	0,05	0,046	1,78	1,696
0,5	1,926	0,085	0,586	0,43	0,047	0,056	1,724	1,741
0,25	2,149	0,069	0,365	0,374	0,046	0,049	1,535	1,499
0,125	2,029	0,071	0,221	0,238	0,048	0,046	1,544	1,248
0,0625	1,965	0,074	0,221	0,189	0,047	0,045	1,205	1,154
0,03125	1,728	0,074	0,171	0,156	0,047	0,047	0,906	0,929
0,0156	1,681	0,066	0,093	0,105	0,051	0,048	0,55	0,511
0,0078	0,964	0,072	0,073	0,087	0,061	0,073	0,276	0,372

- 10 При ідентифікації другого антитіла проти миші середнє значення всіх OD з нерелевантного контролю становить 0,0735, і їхнє стандартне відхилення (SD) становить 0,0057, отже, можна визначити граничне значення, нижче якого всі значення є неспецифічними при 99% довірчому інтервалі: середнє + 3*SD = 0,0907. Всі представлені значення з відповідної мишачим GNBAC1, таким чином, є значимими для специфічного зв'язування білка-мішені.

- 15 При ідентифікації другого антитіла проти людини середнє значення всіх OD з нерелевантного контролю становить 0,0513, і їхнє стандартне відхилення (SD) становить 0,0094, отже, можна визначити граничне значення, нижче якого всі значення є неспецифічними при 99% довірчому інтервалі: середнє + 3*SD = 0,0796. Всі представлені значення з химерними конструкціями GNBAC1, таким чином, є значимими для специфічного зв'язування білка-мішені.

- 20 На Фіг. 6 видно, що як мишаче антитіло IgG GNBAC1, так і химерні варіанти IgG1 й IgG4 ефективні як ідентифікуючі антитіла в сендвіч-аналізі ELISA проти рекомбінантного білка ENV-T у настільки низьких кількостях, як кілька нанограмів очищеного IgG для визначення менш чим декількох нанограмів білку ENV.

- 25 Крім того, оскільки IgG проти людини або миші перехресно не реагує ні з вихідним мишачим антитілом, ні з химерними конструкціями з каркасами IgG1 або IgG4 людини, убудований ліганд (VH+VL) не створює яку-небудь небажану модифікацію й не визначається в людських конструкціях у даних умовах.

5с: Спорідненість GNBAC1 до ENV-T

Таблиця 10

Визначення єдальної спорідненості ліганду, убудованого у вектори антитіла IgG4 й IgG1 (одиниці зазначені в таблиці)

	ENV-T при половині визначення mAb [мг/л]	Концентрація Env [M]	Спорідненість [M]	MM His-ENV-T [г/моль]
Ig1	0,25	1,07E-09	2,46E+08	61,440
Ig4	0,35	5,70E-09	1,76E+08	

30

5d: Ізоелектрична крапка GNBAC1

Ізоелектричну крапку GNBAC1 визначали відповідно до методів, описаними в Fractionation of complex protein mixtures by liquid-phase isoelectric focusing. Hey J, Posch A, Cohen A, Liu N, Harbers A. Methods Mol Biol. 2008; 424:225-39.

- 35 Ізоелектрична крапка конструкцій IgG1 (р 8,3) і Ig4 (р 7,53) досить корисна й буде визначати стабільність й умови зберігання для терапевтичного застосування. Нейтральна рІ IgG4, таким чином, краще для готування препарату терапевтичного MAb, якому можна застосовувати як

хронічне лікування з регулярно повторюваними ін'єкціями. Таким чином, IgG4 із цього погляду є кращою конструкцією.

Приклад 6: Дослідження ліганду і його конструкцій на основі IgG1 й IgG4 людини у порівнянні з GNBAC1: інгібіторна активність у відношенні протизапальних цитокінів у культурах

5 мононуклеарних клітин периферичної крові (МКПК) людини

Матеріали й методи:

Культуральне середовище

МКПК культивували в RPMI Glutamax (Gibco) + 10% ФБС (Biowest S1810 South America) + 1% неесенціальні амінокислоти + 1% піруват + 1% пеніцилін - стрептоміцин, при 37 °C в

10 атмосфері 6,5% CO₂.
Готування препарату МКПК із лейкоцитарних плівки

Лейкоцитарні плівки одержані від HUG.

Кров, розведену ФБС-ФБС 2% (4 мл + 31 мл), обережно нашаровують на 15 мл фіколу й центрифугують при 2850 об/хв (1650 g)/20 хв/кімнатна температура/без перерви.

15 Потім МКПК обережно збирають і промивають 3 рази ФБС-SVF 2% і центрифугують при 1500 об/хв/10 хв.

Потім клітини рахують і заморожують в SVF 90% + ДМСО 10%.

Готування препарату МКПК із заморожених клітин

20 - МКПК, який зберігаються при -80 °C, відтають при 37 °C, промивають 3 рази середовищем і центрифугують при 1500 об/хв/10 хв.

Потім клітини рахують і розводять до концентрації звичайно 1x10⁶ кліток/мл.

Тест на інгібування

25 - Суміш ENV + MAb готують перед тим, як відтають МКПК. MAb (обране відношення з ENV) + ENV (обрана концентрація) змішують у кожній лунці 48-лункових планшетів в 100 мкл середовища й інкубують 1 година при +4 °C.

Потім МКПК додають у кожну лунку для одержання кінцевої концентрації 1 x10⁶ кліток/мл (кінцевий обсяг на лунку 0,5 мл або 1 мл).

Клітини інкубують протягом 24, 48 або 72 годин при 37 °C, 5% CO₂.

30 - Надосадові рідини збирають центрифугуванням при 1400 об/хв/10 хв/КТ і зберігають при -20 °C.

IL-2d Доза цитокінів

Цитокіни дозують із наборів ДК Pharmingen ELISA для IL-6, IL-12p40, TNF-α і IFN-γ. Дотримувалися протоколу постачальника.

Таблиця 11

Доза цитокінів у різних надосадових рідинах культур МКПК
(мононуклеарних клітин периферичної крові) з різними лігандами або без лігандів

			IL-6			IFN-γ		
			пг/мл	Відповідь (%)	Інгібування (%)	пг/мл	Відповідь (%)	Інгібування (%)
Партія ENV	MAb	Відношення MAb/ENV-T			72 г			
ENV-SU 4A 0,5 мкг/мл	Немає Mab	-	88742	100	-	558	100	-
	GNbAC1 мишаче IgG1	25/1	42250	48	52	270	48	52
	GNb AC1 ScFv	25/1	56675	64	36	661	118	-18
	Химерне людське							
	GNbAC1 IgG1 2008	25/1	32871	37	63	606	109	-9
	GNbAC1 IgG4 2008	25/1	52954	60	40	318	57	43

Автори винаходу протестували за допомогою клітинних тестів МКПК потенціал антитіл за винаходом або ScFv у відношенні інгібування взаємодії між білком ENV і клітинами (за допомогою рецептора TLR4) і, отже, продукування протизапальних цитокінів, таких як IL-6 (уроджений імунітет) і IFN- γ (імунітет, опосередкований Т-лімфоцитами). різні молекули тестували при однаковому співвідношенні (моль/моль) з білком (25/1), так щоб можна було зрівняти їх характеристики.

Як видно на Фіг. 7 й у таблиці 11, всі молекули ліганду, як мишачого, так і рекомбінантного походження (scFv або конструкції IgG1 й IgG4 з лігандом) володіють інгібіторними властивостями й зберігають їх, що представлено на підставі зниження протизапальних цитокінів (IL-6), продукованих МКПК.

Проте, видно, що GNbAC1 і рекомбінантний людський IgG4 з убудованим лігандом ефективні при активації лімфоцитів (де обоє знижують продукування інтерферону-гамма), тоді як scFv (тут, найбільше імовірно, у зв'язку з одновалентністю) і конструкція на основі IgG1 людини були значно менш ефективні у відношенні інгібування інтерферону-гамма. Тут той факт, що ділянку Fc IgG1 людини має проактивними ефектами відносно імунних кліток людини, ясно показує, що ця властивість може врівноважувати інгібіторні ефекти ліганду на даний тип активації лімфоцитів ENV. З тим же лігандом у векторі на основі IgG4 людини (який не є імунологічно проактивним) проявляється інгібіторний ефект двовалентного ліганду, як у вихідному мишачому IgG.

Із цієї причини, як і для описаного в розділі 5d прикладу, IgG4 був би кращою конструкцією, коли імунних функцій антитіл варто уникати. Як виявлено в цьому випадку, функції антитіла не тільки є необхідними для інгібіторного ефекту (за умови, що продукується двовалентний ліганд, оскільки моновалентний scFv має слабку ефективність), але також виявлені як шкідливі для інгібіторного ефекту ліганду.

Що стосується ефекту на продукування IL-6 (з моноцитів/макрофагів й, можливо, також В-лімфоцитів), IgG1 й IgG4 виявлені як еквівалентні й проявляють гарне інгібування, яке відрізняється від того, котре спостерігали з інтерфероном-гамма. Цікаво, що одновалентний scFv проявляє менше, але значне інгібування даного цитокіну "уродженого імунітету". Таким чином, деякі імунні активації добре інгібуються обома векторами, на основі IgG1 й IgG4 людини, з лігандом, але IgG4 проявляє унікальне інгібування як уродженого імунітету (результати IL-6), так і набутого імунітету (результати IFN-гамма) клітин із МКПК людини.

Цікаво, що вектор IgG1, тим не менш, забезпечує більш сильне інгібування протизапальних цитокінів уродженого імунітету (представлених тут прикладом IL-6) і запускає деякі клони Т-клітин (що показано дозами інтерферону-гамма), що може проявляти користь у деяких механізмах протівірусного захисту.

Таким чином, автори винаходу підтвердили високу спорідненість і біологічну активність ліганду у формі фармацевтичної доставки, яка складається з векторів антитіла людини, із загальною спорідненістю зв'язування й специфічностями, але імунними ефектами, які розрізняються, залежно від їх ізотипу.

Приклад 7: Молекулярна ідентифікація єднального сайту ліганду на білці-мішені ENV (єднальної послідовності антиліганду)

Епітопне картування вихідного мишачого IgG1/каппа (GNbAC1) отримане Pepscan BV., Нідерланди.

На підставі цих результатів ідентифікована амінокислотна послідовність єднального сайту ліганду, яка повинна бути включена в послідовність, представлену в SEQ ID No. 20.

Включений у вищевказану послідовність, кращий епітоп-мішень, складається в С-кінцевій ділянці відщипленого домену SU (ENV1) у повнорозмірному білці ENV (ENV-T) і більш конкретно відповідає наведеній нижче обраній амінокислотній послідовності, представленій в SEQ ID No. 32.

Ця послідовність антиліганду (і його обрана послідовність) не винятково, але також утримується усередині первинної амінокислотної послідовності білка оболонки MSRV (ENV), як описано в прикладі 2.

Проте, фахівцям у даній галузі техніки відомо, що амінокислоти можуть бути заміщені їхнім функціональним еквівалентом й, у цьому випадку, можуть дати подібний єднальний сайт із іншою послідовністю. Крім того, описані мімотопи "MSRV ENV", які можуть ефективно зв'язуватися зі специфічними антитілами (Jolivet-Reynaud, C, H. Perron, et al. 1999, "Specificities of multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum antibodies against mimotopes", Clin Immunol 93; 3: 283-93).

Приклад 8: Докази присутності білки-мішені MSRV-ENV у пацієнтів з MSRV-асоційованими захворюваннями: Приклади асоційованих захворювань або патологічних синдромів при розсіяному склерозі, клінічно ізольованому (неврологічному) синдромі (KIC), хронічної запальної демієлінізуючої поліневропатії (ХВДП), шизофренії й епілепсії

5 8а. Розсіяний склероз, клінічно ізольовані синдроми й поліневропатії

Матеріали й методи

Імунологічна доза антигенемії ENV

Попередній збір сироватки:

10 Дослідження було схвалено етичними комітетами Університетських клінік Кретея й Гренобля, Франція. Були включені неврологічні пацієнти з обох центрів. Всі пацієнти давали письмову інформовану згоду перед включенням. Здорових донорів крові рекрутували із центрів переливання крові Гренобля й Монпельє. Неврологічні контролю були одержані із Гренобля. Клінічні дані по пацієнтах зазначені в Результатах. Аліквоти зразків сироватки від пацієнтів із РС і здорових контролів кодували й посилали в незалежну лабораторію для сліпого тестування Аро

15 ELISA в умовах колориметричного зчитування.

Європейський багатоцентровий збір сироватки:

20 Дослідження було схвалено етичними комітетами медичного факультету університету Вюрцбургу в Німеччині, університету Сасари, клініки Дону Карло Ньюки Мілану в Італії, клініки університету Марселя у Франції й університету Памплони в Іспанії. Було включено 74 пацієнта з визначеним РС відповідно до критерію Мак-Дональда (McDonald, Compston et al. 2001) і 14 із клінічно ізольованими синдромами (KIC). Відповідні клінічні дані й дані по лікуванню представлені нижче в таблиці 12 (McDonald, Compston et al. 2001). У випадку рецидиву РС зразки крові брали до початку лікування стероїдами. Аліквоти зразків сироватки від пацієнтів із РС і здорових контролів кодували й посилали в незалежну лабораторію для сліпого тестування

25 Аро ELISA в умовах колориметричного зчитування.

Збір зразків: Збирали одну пробірку крові (7мл суха пробірка B&D). Зразки обробляли в межах 2 годин після збору. Після згортання крові їх центрифугували протягом 10 хв при 2800 г при 14 °С. Потім сироватку збирали й ділили на аліквоти по 250 мкл в епіндروفівські пробірки. Аліквоти зберігали замороженими при -20 °С.

30 Імунологічний аналіз АроН-ELISA

Колориметричний спосіб: На мікротитраційні планшети, покриті АроН (АРОН Technologies, Монпельє, Франція), наносили зразки сироваток, розведені в Тріс-НСІ 50 мМ рН 7,6; планшети інкубували протягом 1,5 г при 37 °С; потім планшети промивали чотири рази ФСБ; очищене мишаче mAb анти-ENV розводили ФСБ, яке містить 5% БСА, до концентрації 10 мкг/мл і додавали. Планшети інкубували протягом 1 г при 37 °С, а потім промивали чотири рази ФСБ. Додавали мічений пероксидазою IgG кози проти миші (H+L; Sigma), розведений 1:5000 у ФСБ, який містить 5% БСА, планшети інкубували протягом 1 г при 37 °С, а потім промивали шість разів ФСБ. Додавали розчин субстрату OPD, і планшети інкубували протягом 30 хв у темряві. Колірну реакцію зупиняли 2 н. H₂SO₄. Поглинання зчитували при 490 нм за допомогою пристрою, який зчитує, Тесан. Статистичне граничне значення (С.О., cut-off) даного тесту визначали на серії негативних сироваток від 50 здорових донорів крові (ДК) з одержанням результату від трьох повторів від індивідуальних сироваток у вигляді оптичної щільності (OD). С.О., таким чином, обчислювали на підставі статистично значимої серії негативних контролів у вигляді їхнього середнього значення плюс три стандартних відхилення (А+3SD; значимість позитивності р<0,01) і підтверджували експериментально на панелі стандартів позитивних і негативних зразків. Довірчий інтервал для визначення позитивності тесту, таким чином, являє собою 99,9%.

Люмінометричний спосіб: Зразки, розведені в Тріс-НСІ 50 мМ рН 7,6, наносили на покриті АроН мікротитраційні планшети (АРОН Technologies, Монпельє, Франція). Мікропланшети інкубували протягом 1 г 30 хв при 37 °С, промивали чотири рази ФСБ. Додавали очищене мишаче mAb анти-ENV (1 мкг/мл у ФСБ-БСА 5%). Мікропланшети інкубували протягом 1 г при 37 °С і промивали чотири рази ФСБ. Додавали мічене пероксидазою антитіло кози проти миші (Jackson, розведене 1/2000 у ФСБ-БСА 5%), мікропланшети інкубували протягом 1 г при 37 °С і промивали шість разів ФСБ. Додавали розчин субстрату SuperSignal femto (Pierce) і зчитували за допомогою пристрою, який зчитує, TECAN.

55 Моноклональні антитіла

Моноклональні антитіла (Mab) були розроблені фірмою bioMerieux (Marcy l'Etoile, Франція) після імунізації мишей рекомбінантним білком оболонки MSRV (ENV), експресованих із клонуваних ділянок, ампліфікованих за допомогою ОТ-ПЦР із очищених позаклітинних віріонів MSRV. Після тестування мишачих сироваток за допомогою ELISA клітини селезінки піддавали

60

злиттю з несекретуючою клітинною лінією мієломи Sp2/0-Ag14 з метою одержання гібридом. Специфічні клони були відібрані шляхом скринінгу на їхнє продукування антитіл у такому ж аналізі ELISA. Таким чином, було виділено приблизно 40 Mab, специфічних до білку MSRV/ENV, і приблизно 28 Mab було піддано подальшій селекції, і оцінена їхня єднальна специфічність.

5 Використовуючи метод ApoH-ELISA на сироватках людини, кращим єднальної Mab було 2A12A5.

Результати

Імунологічна доза білку MSRV ENV у сироватці

10 Автори винаходу розробили оригінальний імунологічний аналіз на мікропланшетах, у якому фаза іммобілізації заснована на особливо ефективних властивостях аполіпопротеїну-Н (ApoH) при зв'язуванні з білками мікроорганізмів при асоціації зі структурами оболонки й/або ліпідами (Stefas et al., 1997; Stefas et al., 2001). ApoH дає можливість першої взаємодії з низькою спорідненістю з амінокислотними ділянками самого білку, яка потім активує алостеричну взаємодію, яка викликає ковалентно-подібне зв'язування C-кінцевого домену ApoH з ліпідом або мембранозв'язуваними доменами. Таким чином, білки оболонки вірусу або частки віріонів

15 можуть бути оборотні іммобілізовані, і після стадій відмивання, які видаляють вихідний зразок, специфічні антигени можуть бути визначені шляхом додавання моноклонального антитіла, мішенню якого є усе ще доступний епітоп після стадії іммобілізації "ApoH".

20 Для технічної оцінки тесту як віріон MSRV, осаджений й очищений з надосадових рідин культури В-кліток РС відповідно до раніше описаних умов (Perron et al., 1997a; Perron et al., 1997b), так й очищений рекомбінантний білок оболонки MSRV (ENV) тестували із серійними розведеннями й різними Mab анти-MSRV ENV. Порівняння проводили з добре відомими вірусами, такими як вірус гепатиту С (HCV) і вірус гепатиту В (HBV), обумовленими відповідної специфічним Mab. Після додаткових випробувань із реальними зразками сироваток було

25 показано, що Mab 2A12A5 найбільш ефективно для діагностичного імунологічного визначення після стадії іммобілізації ApoH, і воно було збережено для наступних досліджень.

Перше сліпе попереднє дослідження: Розсіяний склероз (РС) і хронічна запальна демієлінізуюча поліневропатія (ХВДП).

30 Для попередньої оцінки даного імунологічного аналізу в різних групах пацієнтів з різними захворюваннями автори винаходу спочатку аналізували сироватки від 29 пацієнтів із РС, від 28 пацієнтів з іншими неврологічними захворюваннями, від 60 пацієнтів з не неврологічними захворюваннями й від 50 здорових донорів крові (усього 167 зразків сироватки). Результати представлені в таблиці 12 для РС й інших неврологічних захворювань.

35 Таблиця 12. Тест на імунологічне визначення ENV для ідентифікації MSRV-асоційованих захворювань або MSRV-асоційованих підгруп пацієнтів. Результати APO-H ELISA на першій серії сироваток - пацієнти з розсіяним склерозом (РС), пацієнти з іншими неврологічними захворюваннями (ДНЗ), пацієнти із хронічною запальною демієлінізуючою поліневропатією (ХВДП) і здорові донори крові (ДК). Тести ELISA зі стадією іммобілізації APO-H (Stefas et al., 1997) проводили з моноклональним IgG (2A12A5 для MSRV ENV), отриманим і підданим скринінгу на

40 специфічність фірмою bioMerieux, Marcy L'Etoile, Франція. N= число пацієнтів, нз = не зареєстрований, OD = оптична щільність, П = прогресуюча, РП = ремітуюча прогресуюча, ЗР = зворотньо-ремітуюча. CO= граничне значення, яке визначає граничне значення, нижче якого результат тесту є негативним. Воно визначено із серії здорових донорів крові, як показано внизу, з їхнім середнім значенням плюс його трикратне стандартне відхилення (99% довірчий інтервал). Відношення OD/CO = OD, ділена на CO експерименту, яка дозволяє розрізнити

45 позитивні результати (>1) і негативні (<1).

(а) Пацієнти з розсіяним склерозом (N=29)

Пацієнт	Клінічна форма	Тривалість (роки)	Відношення OD/CO
1	РП	6	1,84
2	РП	1	1,64
3	ВР	3	1,62
4	ВР	4	1,54
5	нз	2	1,54
6	нз	нз	1,35
7	нз	нз	1,31
8	нз	нз	1,37
9	8	8	1,11
10	19	19	1,19
11	2	2	1,12
12	нз	нз	1,19
13	нз	нз	1,12
14	нз	нз	1,11
15	нз	нз	1,06
16	1	1	1,21
17	5	5	1,18
18	7	7	1,18
19	1	1	1,06
20	4	4	1,09
21	3	3	1,18
22	4	4	1,28
23	2	2	1,03
24	26	26	0,95
25	22	22	0,99
26	4	4	0,90
27	22	22	0,70
28	14	14	0,96
29	18	18	0,92

(б) Пацієнти із ДНЗ (N=20)

Пацієнт	Тип захворювання	Відношення OD/CO
1	Епілепсія	0,910
2	Хронічний поліміозит	0,940
3	Первинна пухлина головного мозку	0,640
4	Ішіас	0,940
5	Синдром Гієна-Барре	1,000
6	Удар	0,840
7	Первинна пухлина головного мозку	0,880
8	Мультисистемна атрофія	0,88
9	Параліч лицьового нерву	0,940
10	Синдром Гієна-Барре	1,000
11	Епілепсія	0,930
12	БАС	0,680
13	Синдром Гієна-Барре	0,830
14	Церебральний метастаз (рак легені)	0,910
15	Хвороба Лея	1,000
16	Епілепсія	0,800
17	Травма спинного мозку	0,810
18	Церебральний абсцес (Listeria)	0,930
19	Епілепсія	0,800
20	Удар	0,960

(в) Пацієнти із ХВДП (N=8)

Пацієнт	Відношення OD/CO
1	1,13
2	1,27
3	1,06
4	1,08
5	1,06
6	0,90
7	0,86
8	0,93

Результати, рівні 1, вважають "невизначеними", і відповідні зразки або нові зразки від тих же індивідуумів повинні бути протестовані знову в окремому експерименті для визначення. Середнє значення (середнє) і стандартне відхилення - s.d. - всіх оптичних щільностей визначено в кожній групі й підгрупі суб'єктів, як зазначено нижче:

ДК (N=50): середнє значення 0,53, s.d. 0,16.

РС (N=29): середнє значення позитивних РС (N=23) 1,27 s.d. 0,22, середнє негативних РС (N=6) 0,90 s.d. 0,25, середнє значення всіх РС 1,20 s.d. 0,25.

ДНЗ (N=20): середнє значення негативних ДНЗ 0,88 s.d. 0,10.

ХВДП (N=8): середнє значення позитивних ХВДП (N=5) 1,12 s.d. 0,09, середнє негативних ХВДП (N=3) 0,9 s.d. 0,03, середнє всіх ХВДП 1,04 s.d. 0,13.

Автори винаходу проаналізували сироватки від 29 пацієнтів РС із Франції (19 із Кретея, 10 із Гренобля) як первинна оцінка даного імунологічного аналізу в різних групах пацієнтів з різними захворюваннями. Результати в пацієнтів РС представлені в таблиці 12а. Десять здорових донорів крові використали як негативні стандарти для визначення межі позитивності (граничне значення або СО, граничне значення, нижче якого специфічний сигнал не визначається). У відповідності зі статистичним граничним значенням цих серій 23 пацієнта РС мають значимо позитивну антигенемію MSRV-ENV (середня OD = 0,88), тоді як 6 можна вважати негативними, хоча скоріше близькими до порогу (середня OD "негативних РС" = 0,62). Цікаво, що негативні випадки РС мали більш тривалу тривалість імовірно доброякісних форм (#24, 25, 28) або додержувалися протоколу лікування циклофосфамідом.

Паралельно автори винаходу проаналізували сироватки від 28 пацієнтів з іншими неврологічними захворюваннями (ДНЗ) (12 із Кретея, 16 із Гренобля). П'ятеро пацієнтів мало позитивний результат, таким чином, представляючи приблизно 18% протестованих пацієнтів із ДНЗ. Проте, всі позитивні випадки ДНЗ мали подібний діагноз: хронічна запальна демієлінізуюча поліневропатія (ХВДП), тоді як пацієнти із ДНЗ із іншими діагнозами всі були негативними (або "невизначеними" на граничній межі, як для одного випадку гострого синдрому Гієна-Барре). Таким чином, результати від пацієнтів із ДНЗ представлені в таблиці 12б як ДНЗ без ХВДП окремо від пацієнтів ХВДП (таблиця 12в). Приблизно половина випадків ХВДП є позитивною, але, з обліком дійсних низьких чисел, автори тут не мали на увазі дослідження "запальних" проти "незапальних" неврологічних захворювань.

Крім того, автори винаходу паралельно протестували сироватки від інших не неврологічних захворювань (ДННЗ), таких як 15 пацієнтів із хронічною вірусною інфекцією гепатиту В, а також 15 пацієнтів із хронічною вірусною інфекцією гепатиту С. Із цих 30 зразків жоден не був виявлений як позитивний. Поліреактивні сироватки від 30 пацієнтів з анти-ДНК, протиядерним і протиревматоїдним факторами, які звичайно перешкоджають різним серологічним тестам, не дали ніякого позитивного результату. П'ятдесят сироваток від здорових донорів крові були також паралельно протестовані. Жодна не була виявлена як позитивна.

Порівняння результатів групи РС із будь-якою іншою групою показує значиме розходження, за винятком підгрупи ХВДП. Значення оптичної щільності від повних груп РС і ДНЗ (включаючи негативні РС і ХВДП) при порівнянні за допомогою непараметричного критерію (критерій нормальності був невдалим) досить значно розрізняються ($p = <0,001$; критерій суми рангів Манна-Уїтні $T = 517000$). При порівнянні повної групи РС із усіма випадками ХВДП статистичне розходження більше не виявлялося ($p = 0,053$; критерій суми рангів Манна-Уїтні $T = 99000$). Ніякого статистичного розходження не підтвердили для значень OD "позитивних РС" й "позитивних ХВДП" ($p = 0,072$; критерій суми рангів Манна-Уїтні $T = 42000$).

Європейська багатоцентрова серія сироваток при сліпому тестуванні: Розсіяний склероз (РС) і клінічно ізольований синдром (KIC)

З метою підтвердження перших результатів з більшою групою пацієнтів РС із різних географічних областей автори винаходу рекрутували сироватки в рамках багатоцентрового співробітництва з неврологічними відділеннями з різних європейських країн. У цих зразках автори винаходу використали люмінометричне зчитування з метою поліпшення виявлення сигналу й диференціації з неспецифічним фоновим "шумом".

Після внутрішніх оцінок сироваток колориметричним способом порівняння з люмінометричним зчитуванням підтвердило посилене виявлення й динаміку сигналу. Таким чином, узяття зразків сироватки для аналізу в чотирьох повторах проводили у випадково відібраних пацієнтів РС із усіма формами й тривалостями захворювання, в основному, при тривалому специфічному лікуванні, але представляючих кожне географічне походження з даної мережі клінік. Їх кодували й посилали для сліпого тестування в централізовану лабораторію (АРО-Н технології, Монпельє, Франція). Не кодовані сироватки (10 негативних контролів й 10 позитивних РС) посилали для технічної оцінки на визначення граничного значення. Крім того, 14 сироваток від клінічно ізольованого синдрому (KIC, окремий неврологічний епізод і додатковий прояв й/або біологічні аномалії) посилали в кодованому вигляді на сліпе тестування в рамках даної серії. Це була перша оцінка при KIC, і очікували, що вона включає більшість перших епізодів РС.

Результати представлені на Фіг. 8 (результати АроН-ELISA сироваток з європейського багатоцентрового дослідження, протестованих наосліп у незалежній лабораторії). Вони виражені у вигляді відношення люмінометричних одиниць (RLU), ділених на граничне значення, визначене в таких же експериментах, таким чином, порівнянно з відношенням для попередньої серії (див. таблиця 9). Дійсно, діапазон відносин (1-6), отриманих тут у межах сироваток "позитивного РС" за допомогою люмінометрії, підтверджує технічну оптимізацію динаміки сигналу в порівнянні з колориметрією (від 1 до 2).

Результати АроН-ELISA сироваток з європейського багатоцентрового дослідження, протестованих наосліп у незалежній лабораторії

Використовуваним способом зчитування була люмінометрія, і результати представлені на осі Y у вигляді відносини індивідуальних люмінометричних одиниць (RLU), поділених на граничне значення, визначене на серії стандартних негативних сироваток у тому ж експерименті. Таким чином, значення >1 є позитивними.

Статистичні аналізи люмінометричних результатів АРО-Н ELISA між групами дали наступні результати (значення р критерію Фішера): (i) порівняння ДК проти всіх РС, ДК проти всіх РС + KIC, ДК проти ВР-РС, ДК проти ПП-РС, ДК проти ВП-РС, ДК проти KIC: $p < 0,001$; (ii) порівняння KIC проти ВР-РС: $p = 0,759$, KIC проти ПП-РС: $p = 0,704$, KIC проти ВП-РС: $p = 0,749$, ВР-РС проти ПП-РС, ВП-РС: $p = 1$, ПП-РС проти ВП-РС: $p = 1$.

У цьому випадку 54 з 74 невідібраних випадків РС (73%), які мають походження з різних країн і регіонів дослідження, мали позитивну антигенемію за білком MSRV ENV, але жоден із закодованих 26 ДК (як для 10 незакодованих ДК, використовуваних як стандартні зразки для експерименту) не мав. Присутнє розходження між РС і ДК було у високому ступені значимим (критерій Хі-квадрат: $p < 0,0001$), але в окремих "несліпих серіях" з більшими числами (більше ста) виявлено трохи позитивних здорових або безсимптомних донорів крові (4/103; не показано). Цікаво, що 9 з 14 KIC (приблизно 64%) були позитивними, але з більш низькими значеннями.

Значення від різних груп (РС, ДК, KIC), а також від різних підгруп, які представляють різні форми РС: первинно прогресуючий (ППРС), вторинно прогресуючий (ВПРС) і Зворотньо-ремітуючий (ЗРРС), порівнювали за допомогою критерію Фішера. Результати від здорових донорів значимо відрізнялися від всіх комбінацій РС і KIC (постійно $p < 0,001$), тоді як ніякого значимого розходження у виявленні антигенемії MSRV ENV не спостерігали між будь-якими підгрупами, які представляють або можливий (KIC), або певний РС, або різними формами розвитку захворювання РС (71% були позитивними при ЗРРС, 78% при ППРС, 70% при ВПРС). Проте, деяка тенденція гетерогенності в підгрупах KIC у порівнянні із РС проілюстрована більше низькими значеннями р: $p =$ від 0,7 до 0,75, проти $p = 1$ між формами РС, де останнє значення виявляє статистично ідентичний розподіл результатів.

8b. Серія психіатричних захворювань: Шизофренія - SCZ.

Пацієнти й способи

Пацієнти й здорові контролі

Пацієнти, які відповідають критеріям DSM-IV (Американська психіатрична асоціація: Посібник з діагностики й статистики психічних розладів, DSM-IV; 1994) для шизофренії, були випадковим чином відібрані наприкінці госпіталізації із приводу гострого епізоду у філії кафедри психіатрії Французького університету. Неврологічний розлад, гостра або хронічна інфекція й

позитивна серологія на віруси імунodefіциту людини (ВІЛ 1+2), віруси гепатиту В й С становили критерії виключення. Розподіл за віком і статтю в цих нормальних контролях статистично не відрізнялося від даної групи пацієнтів. Психотичні симптоми оцінювали за допомогою французької версії Шкали ознак і симптомів психотичного захворювання - SSPI (Houenou et al., 2007). Симптоми настрою оцінювали за допомогою оцінної шкали манії Bech and Rafaelsen й оцінної шкали депресії Монтгомері й Асберга - MADRS (Bech et al., 1978; Montgomery and Asberg, 1979). Протокол був схвалений місцевим етичним комітетом. Від всіх суб'єктів одержували підписану інформовану згоду після повного опису дослідження психіатром, відповідальним за клінічні оцінки пацієнтів.

Збір сироватки

Одну пробірку (суху 7 мл пробірку B&D) крові обробляли в межах 2 годин після збору: після згортання їх центрифугували протягом 10 хвилин при 2800 g й 14 °C. Сироватку збирали, ділили на аліквот у слабо єднальні пробірки й зберігали при -80 °C.

Імунологічний аналіз

Тести ELISA зі стадією іммобілізації APO-H (Stefas et al., 1997) проводили з моноклональними IgG (2A12A5, 6A2B2 для MSRV ENV й 2G5E12 для MSRV GAG), отриманими й підданими скринінгу на специфічність фірмою bioMerieux, Marcy L'Etoile, Франція.

100 мкл на лунку зразків, розведених 1/10 у Tris-HCl 50 mM рН 7,6, наносили на мікропланшети, покриті ApoH (APOH Technologies, Монпельє, Франція). Мікропланшети інкубували протягом 2 годин при 37 °C, промивали чотири рази 250 мкл ФСБ на лунку. Додавали 100 мкл на лунку першого антитіла (10 мкг/мл у ФСБ-БСА 2%), мікропланшети інкубували протягом 1 години при 37 °C і промивали чотири рази ФСБТ 0,05% і двічі ФСБ. Додавали 100 мкл на лунку міченого пероксидазою антитіла (проти миші Jackson, 1/250 у ФСБ-БСА 2%), мікропланшети інкубували протягом 1 години при 37 °C і промивали, як описано вище. Додавали 100 мкл на лунку розчину субстрату (OPD), мікропланшети інкубували протягом 30 хвилин у темряві, і реакцію зупиняли H₂SO₄ 2 н. (50 мкл на лунку). Поглинання зчитували при 490 нм за допомогою пристрою, який зчитує, Biotek.

Статистичні аналізи:

Статистичні аналізи проводили за допомогою програмного забезпечення SigmaStat. Для порівняння серії даних був обраний непараметричний критерій суми рангів Манна-Уїтні, оскільки їхній розподіл ніколи не відповідав нормальному розподілу (критерій нормальності не виконувався). Критерій хі-квадрат використали для порівняння переваги позитивної антигенемії проти негативної в кожній популяції, для кожного антигену й/або кожного використовуваного антитіла. Граничне значення для кожного стану, при якому одержані результати, обчислювали на підставі статистичної серії негативних контролів як їхнє середнє значення плюс три стандартних відхилення (M+3SD; значимість позитивності: p<0,01) і підтверджували на стандартних позитивних і негативних зразках. Включено результати 49 пацієнтів із шизофренією й 49 контролів, які відповідають за віком (33 +/- 6,5 років) і статі (73% чоловіків, 27% жінок). Було включено вісім пацієнтів при первинному виникненні шизофренічного розладу, тоді як більшість (N = 41) страждало важкою хронічною шизофренією. Вони були еутимічними при включенні як для депресивних балів (середнє MADRS = 5,6 + 6,6) і для маніакальних балів (середній бал Бека = 4,8 + 4,5). Всі пацієнти, крім одного без лікування, приймали нейроліптичні лікарські засоби (27% класичні й 71% атипичні нейролептики). Одна третина пацієнтів (N = 13) були стійкими до лікарських засобів відповідно до критерію Кена (Kane 1996).

Для антигену MSRV GAG було протестовано 49 контролів й 49 пацієнтів із шизофренією. Для MSRV ENV було протестовано 30 контролів (внаслідок технічних обмежень) і 49 пацієнтів із шизофренією. Результати імунологічного аналізу виражали у вигляді середньої оптичної щільності, одержаної на дублікатах сироватки, діленої на граничне значення, щоб зробити всі серії порівнюваними з нормалізованими значеннями (фіг. 22 і таблиця 10).

47% (N = 23) і 43% (N = 21) суб'єктів із шизофренією мали позитивну антигенемією MSRV ENV, відповідно, з антитілами 2A12A5 й 6A2B2. 49% (N = 24) пацієнтів із шизофренією володіли позитивною антигенемією MSRV GAG, де один був позитивним, і один був "прикордонним" тільки для GAG. Порівняння зі здоровими контролями виявило значиме розходження в перевазі позитивних (критерій хі-квадрат p<0,001 для обох визначень ENV; p<0,0001 для GAG). Порівняння значень ELISA у пацієнтів проти контролів за допомогою критерію суми рангів Манна-Уїтні також підтвердило у високому ступені значимі розходження (p<0,001; таблиця 2). Серед контролів один суб'єкт володів значимою позитивною антигенемією. Цікаво, що була присутня позитивна кореляція між результатами для білка ENV і результатами, отриманими для білка GAG. Порівняння значень ELISA, отриманих з анти-ENV 6A2B2, зі значеннями, отриманими з анти-GAG 2G5E12, за допомогою критерію суми рангів Манна-Уїтні не виявило

значимого розходження ($p = 0,744$), як і для анти-ENV-2A12A5 у порівнянні з анти-GAG-2G5E12 ($p = 0,290$) і для анти-ENV-6A2B2 у порівнянні з анти-ENV-2A12A5 ($p = 0,159$). Таким чином, ці антитіла визначали еквівалентну й/або паралельну експресію антигенів MSRV:

Значення антигенемії "ENV" по ELISA варіювали серед позитивних, як показано в таблиці 10 підвищеними стандартними відхиленнями (0,28 для антитіла 2A12A5, 0,48 для 6A2B2), у порівнянні з негативними контролюми (0,09 й 0,08 відповідно). Це підтверджує виявлення динамічного продукування антигенів MSRV у деяких пацієнтів із шизофренією.

Емпіричний коефіцієнт імунологічного аналізу (ELISA) (вісь Y) являє собою середню оптичну щільність, обмірювану на дубльованих лунках від однієї й тієї ж сироватки, ділену на граничне значення відповідної серії (див. Матеріали й методи). Антиген ENV дозують або моноклональним антитілом 2A12A5, або моноклональним антитілом 6A2B2, і антиген GAG дозують моноклональним антитілом 2G5E12, як зазначено у відповідних колонках зі значеннями за графіком.

На Фіг. 9 середнє значення й довірчі інтервали (0,01 й 0,001) представлені стовпчиками й прямокутниками, а розподіл максимальних і мінімальних значень для кожного антигену й антитіла (зазначених зверху кожного стовпчика) представлено крапками. Серія значень від пацієнтів із шизофренією зазначена як "SCZ" унизу відповідних графіків, а значення від здорових донорів крові відзначені "Контролі" (унизу осі X).

Таблиця 13

Дози капсиду (GAG) і оболонки (ENV) MSRV у сироватках пацієнтів із шизофренією (SCZ) і контролів

	MSRV ENV		MSRV GAG			
	антитіло 2A12A5		антитіло 6A2B2		антитіло 2G5E12	
Число позитивних на сироватки протестованих популяцій	SCZ	Контролі	SCZ	Контролі	SCZ	Контролі
	23/49	1/30	21/49	0/30	24/49	2/49
	46,94%	3,33%	42,86%	0,00%	48,98%	4,08%
Число позитивних в SCZ проти ДК: критерій хі-квадрат	$\chi^2=16,73$ ($P<0,001$)		$\chi^2=17,51$ ($P<0,001$)		$\chi^2=25,34$ ($P<0,0001$)	
Стандартне відхилення: Позитивні SCZ сироватки/негативні контрольні сироватки	Позитивні SCZ 0,28	негат. контрольні 0,09	Позитивні SCZ 0,48	негат. контрольні 0,08	Позитивні SCZ 0,47	негат. контрольні 0,15
Число позитивних при SCZ проти ДК, критерій суми рангів Манна-Уїтні	$T=603,000$ ($P<0,001$)		$T=638,000$ ($P<0,001$)		$T=1451,500$ ($P<0,001$)	

SCZ: Пацієнти із шизофренією; ДК: здорові донори

8с. Інші неврологічні захворювання: Епілепсія

Тести ELISA проводили, як описано вище (8b). Пацієнтів з епілепсією й нормальні контролю тестували паралельно на присутність білка MSRV-ENV у їхніх сироватках. Результати представлені на фіг. 10.

Кожен вертикальний стовпчик представляє середню OD дубльованих результатів сироватки від одного пацієнта з епілепсією (38 ліворуч) або контролю (24 праворуч).

Горизонтальна чорна смуга представляє граничне значення тесту, вище якої певний сигнал є специфічним для присутності антигену в сироватці. Його визначають як середнє результатів від здорових донорів крові (контролів) плюс три стандартних відхилення.

Таким чином, тут автори винаходу визначили підгрупу з 8 пацієнтів з MSRV-ENV-асоційованою епілепсією, які можуть просто відповідати підгрупі з даної конкретної етіології серед інших випадків з іншою етіологічною причиною. Тільки MSRV-позитивна епілепсія є релевантною для лікування лігандом анти-ENV, наприклад, у векторах антитіл.

8d: Пацієнти із псоріазом

Давно відомо, що в пацієнтів із псоріазом експресується подібний ретровірус (Iversen, O. J. (1990), "The expression of retrovirus-like particles in psoriasis" J Invest Dermatol 95(5 Suppl): 41S-43S/Bjerke, J. R., G. Haukenes, et al. (1983), "Activated T lymphocytes, interferon, and retrovirus-like particles in psoriatic lesions" Arch Dermatol 119(12): 955-6). Тому їх релевантність для даних терапевтичних векторів, які містять ліганд, очевидна для фахівця в даній галузі техніки.

Приклад 9: Ефективність *in vivo* фармацевтичних векторів, які містять ліганд і зберігають спорідненість ліганду з характеристиками активності проти GnbAC1. Дані *in vivo* по протизапальним, імунопротективним і нейропротективним ефектам ліганду, який доставляє у формі ліганду, включеного у вектор, з відповідним фармакологічним векторним з'єднанням:

5 Приклад терапевтичного ефекту у тварин нейрозапальних моделях, моделях демієлінізації й/або нейрональної дегенерації

Матеріали й методи

MSRV/ENV-індукований EAE (експериментальний аутоімунний енцефаломієліт) у гуманізованої моделі мишей SCID (huSCID)

10 Вільних від патогенів мишей з SCID (важкий комбінований імунодефіцит) у віці 6-8 тижнів купували в Charles River, Франція. Гуманізація мишей була досягнута, використовуючи МКПК від здорових донорів крові (Etablissement Frangais du Sang, Ліон, Франція), відповідно до раніше описаного протоколу (Firouzi et al., 2003). Зокрема, миші були опромінені гамма-випромінюванням й отримували антитіло анти-NK, після чого їх гуманізували 50×10^6 МКПК

15 людини шляхом внутрішньочеревної (i.p.) ін'єкції. Потім якість гуманізації контролювали шляхом специфічного визначення імуноглобуліну людини в сироватці миші. Коли був потрібний більш ніж один донор на серію, всі підгрупи huSCID робили порівняннями за рахунок однакової частки мишей, гуманізованих від кожної здачі крові.

20 Була необхідна затримка на 2 тижні перед включенням до протоколу EAE (перед першою ін'єкцією мієлінового антигену). Потім групам мишей ін'єктували або основний мієліновий білок (MBP) і неповний ад'ювант Фрейнда (IFA, який містить тільки розріджувачі) для "помилкових-контрольних" груп, або ін'єктували MBP й очищений, вільний від ендотоксинів білок MSRV ENV, гомогенізований у розріджувачах IFA для "ENV-індукованого" EAE. Коли активність захворювання спостерігали клінічно й по MPB по наявності викликаних ушкоджень і

25 прогресуючих клінічних порушень, ефект відібраних лігандів анти-ENV у порівнянні з вихідним мишачим моноклональним антитілом (GnbAC1) досліджували при ін'єкції хворим мишам (MBP-EAE, індукований ENV у мишей huSCID).

Для індукції або "помилкової індукції" тварин з EAE спочатку ін'єктували с.с. (підшкірно) у шию на добу 0 або 50 мкг MBP людини + 150 мкг пептиду MBP (пептиду MBP 87-99) + 20 мкг

30 рекомбінантного білка ENV+IFA (група ENV), або 50 мкг MBP людини + 150 мкг пептиду MBP (пептиду MBP 87-99) + тільки IFA (контрольна група). Також ін'єктували 200 нг коклюшного токсину (PTX) на тварину i.p. через 2 доби у всіх групах. Другу ін'єкцію внутрішньочеревним (i.p.) шляхом тих же компонентів у тій же дозі (включаючи пептид MBP і повнорозмірний білок MBP людини), який відповідає попередньому опису для кожної групи, проводили на зазначену добу

35 (таблиця 11). Її також супроводжували такою ж ін'єкцією 200 нг PTX на тварина. Третю й останню ін'єкцію тих же імуногенних агентів проводили с.с. на протилежній стороні шиї на зазначену добу (таблиця 14), супроводжуючи такою ж ін'єкцією PTX.

Таблиця 14

Серія доклінічної оцінки обробки антитілом: опис різних груп і протоколів для ENV-індукованих і контрольних "MBP-EAE" у мишей Hu-SCID

Групи	Опис	Ін'єкції	Компоненти		MAb (100 мкг на добу)	Клінічна оцінка	
			IFA	ENV (20 мкг)		Клінічний бал	MPB (доба)
1	Контрольні миші	X	X			щодоби	17;24;31;43; 50
2	Контрольні миші	X	X	-	19;35	щодоби	17;24;31;43; 50
3	Миші з EAE		X	X	-	щодоби	17;24;31;43; 50
4	Миші з EAE	X	X	X	35	щодоби	17;24;31;43; 50
5	Миші з EAE	X	X	X	19;35	щодоби	17;24;31;43; 50

40 Для спостереження тварин виділяли 5 діб в тиждень й оцінювали клінічний бал. Клінічний бал оцінювали за наведеним нижче критерієм: 0 = немає ознак; 1 = параліч хвоста або гіперрефлексія задньої кінцівки(ок) або одностороння слабкість задньої кінцівки; 2 = двостороння слабкість задніх або передніх кінцівок; 3 = додатково односторонній параліч або загальне порушення; 4 = повний параліч задніх або передніх кінцівок; 5 = додатково частковий параліч

45 або загальне порушення протилежних кінцівок; 6 = агонія або смерть.

Загальна тривалість експериментів з Hu-SCID не перевищувала двох місяців, за винятком досліджень виживаності, які включають оброблених mAb і контрольних мишей (чотири місяці).

MPB й імуногістохімічний аналіз (зображення не показані в даному прикладі):

Моніторинг тварин проводили за допомогою Т2-зваженого аналізу МРВ і посмертної гістології, яка підтвердила обидва типи ушкоджень із запаленням і демієлінізацією у центральній нервовій системі, а також візуалізацію (МРВ) різкого поліпшення картини запалення в оброблених мишей із клінічним поліпшенням.

5 Результати

Миші SCID з лімфоїдною системою людини (щепленою, як зазначено вище) забезпечують гібридних тварин з функціональною імунною системою людини. У цьому випадку ці тварини одержували три ін'єкції білка MSRV ENV, емульгованого з МРВ у масляних розріджувачах (IFA), на добу, зазначені синіми стрілками. Коли тварини мали підвищений клінічний бал при тривалому запаленні нервової системи, візуалізованому за допомогою МРВ (ЕАЕ), їм ін'єктували однократну дозу (10 мкг внутрішньочеревно) вихідного мишачого моноклонального антитіла (GNbAC1, зазначеного як hulg на Фіг. 10) або однієї з конструкцій на основі IgG1 або IgG4 людини з лігандом (зазначеної як hulg1 й hulg4 на Фіг. 11). Група, залишена неопрацьованою з метою порівняння з обробленими тваринами, і "фальшиво-контрольна" група, ін'єктована МРВ в IFA без ENV, залишалися здоровими, але одержували ін'єкцію вихідного мишачого антитіла (GnbAC1) на ту ж добу, що й оброблені хворі тварини.

Як видно на підставі результатів, проілюстрованих на Фіг. 11 й 12, всі неопрацьовані миші загинули через 30 діб й мали важке клінічне прогресування після останньої із трьох ін'єкцій білка MSRV ENV. Важкі ушкодження були видні на гістології й імуногістології, які виявляють демієлінізацію, інфільтрацію лімфоїдних клітин, загибель нейронів, руйнування гематоенцефалічного бар'єру й астрогліоз. Цікаво, що при розсіяному склерозі руйнування гематоенцефалічного бар'єру також є характерною ознакою активних ушкоджень ЦНС.

Таким чином, мишаче антитіло або химерний IgG1 або 4 людини, який містить ліганд, спрямований на ENV, могли дифундувати в результаті внутрішньочеревної ін'єкції по всьому організмі й, зокрема, в активні ушкодження ЦНС у хворих тварин.

Дивно, що криві виживання показали 100 % виживання у тварин, оброблених або IgG1, або IgG4 химерними антитілами, у порівнянні з 0 % у неопрацьованих тварин на добу 35. Зненацька вихідне мишаче антитіло IgG1/каппа (GnbAC1) мало меншу ефективність при ін'єкції в такий же дозі, оскільки одна тварина загинула на добу 28. Крім того, клінічні криві на Фіг. 11 показують дуже гарне й тривале поліпшення у тварин, оброблених конструкціями на основі IgG1 або 4 людини, але тільки стабілізацію й слабе поліпшення у тварин, оброблених вихідним мишачим антитілом.

Таке різке поліпшення у тварин, оброблених лігандом у векторах IgG1 або IgG4 людини, було також доведене МРВ моніторингом у порівнянні з неопрацьованими контролями.

Таким чином, клінічна ефективність химерного IgG1 або 4 людини підтверджена на тваринних моделях, які проявляють запалення нервової системи, демієлінізацію, загибель нейронів, руйнування гематоенцефалічного бар'єру й астрогліоз у центральній нервовій системі (ЦНС; див. моделі Hu-SCID й C57/bl6, ін'єктовані білком MSRV ENV). Несподіванно ефективність поліпшена в порівнянні з вихідним мишачим IgG, який містить той же ліганд (VH+VL ланцюга).

Таким чином, терапевтична ефективність у даній нейрозапальній тваринній моделі робить її очевидною для інших застосувань при MSRV-асоційованих захворюваннях або синдромах, як визначено в тексті даного винаходу.

Крім того, несподіваний "ефект ліганду" мінімальній композиції або конструкції, яка містить 6 CDR, певної в прикладі 1, дає можливість застосовувати ліганд повністю незалежно від функцій антитіла, але також варіювати й вибирати додаткову цінність і відносний інтерес різних векторів (не винятково, які відносяться до IgG ізотипів) для кожного можливого терапевтичного застосування.

Приклад 10: Білок MSRV-ENV виявляється з великою інтенсивністю в деяких клітинах з біопсій у пацієнтів із солідною пухлиною або з біопсій у пацієнтів з лімфопроліферативними розладами або лімфоїдними раками

Матеріали й методи:

- Тестоване антитіло

GNb AC1, 1,0 мол, концентрація: 5,918 мг/мл

55 - Негативне контрольне антитіло

Білок мієломи миші IgG1 каппа (MOPC-21, Sigma), 1,0 мл, концентрація: 1,0 мг/мл

Дане антитіло використали одночасно з тестованим антитілом.

- Інгібований білок

ENV-T (MSRV ENV, GeNeuro SA), 10 мл (10 × 1 мл флакони), концентрація: 0,05 мг/мл

60 Цей антиліганд використали одночасно з тестованим антитілом.

- Зразки тканин людини

Етично зібрані тканини людини при повній згоді пацієнта були одержані із зовнішнього джерела.

Всі тканини піддавали тестуванню на антигенність. Перед пошуком тканин, прийнятних для використання в даному дослідженні, проводили оцінку білка з розповсюдженою експресією на зрізі з імуногістохімічним фарбуванням; S100, CD45, десміну, цитокератину або виментину, пов'язаних з кожною тканиною.

- Валідизація аналізу

Досліджувані параметри включали:

1. Порівняння фарбування в позитивній контрольній тканині з використанням фіксації нейтральним забуференим формаліном, параформальдегідом й ацетоном.

2. Використання підходящого способу виявлення імуногістохімічним фарбуванням.

3. Визначення оптимального титру тестованого антитіла, досліджували від 0 до 5,0 мкг/мл (ізотипічний контроль антитіла ставили при тих же концентраціях).

4. Вірогідність специфічності фарбування підтверджували шляхом виключення тестованого антитіла, замінюючи його буфером. Крім того, антигенні єднальні сайти MSRV блокували, використовуючи білок ENV-T перед інкубацією тканини.

5. Використали будь-яке необхідне блокування ендogenous речовин, які можуть перешкоджати сигналу антигену-мішені.

- Спосіб імуногістохімічного (ІГХ) фарбування

У результаті отриманих дані фази валідизації кожний зі зразків тканини піддавали скринінгу одночасно, як описано нижче:

- GnbAC1 виключали з методики фарбування

- антитіло MOPC-21 при 1,0 мкг/мл

- GnbAC1 при 0,25, 1,0 й 3,0 мкг/мл

Кожен зразок тканини оцінювали, використовуючи світловий мікроскоп. Система оцінки дозволяла ідентифікувати тип тканини й клітин і суб'єктивно відбивати інтенсивність цього фарбування.

Все фарбування в тканинах, оброблених або негативним контрольним антитілом, або без антитіла, і яке специфічно не окреслювало індивідуальні клітини, уважали неспецифічним. Специфічне фарбування не було зареєстровано для тканин, оброблених тестованим антитілом, коли імуногістохімічне фарбування в цих тканинах було подібним по інтенсивності й розподілу із тканинами, які не були оброблені тестованим антитілом, і де індивідуальні клітки не були специфічно обкреслені.

Позитивне фарбування реєстрували за назвою тихорецької структури або типу клітин, а потім указували інтенсивність, як описано нижче:

0 Негативна

+ Слабка

++ Помірна

+++ Виражена

Частоту фарбування, ідентифікованого в кожному типі клітин, указували, як описано нижче:

<10 % Мало

11-40 % Трохи

41-75 % Багато

>76 % Більшість

Якщо зріз не вважали придатним для оцінки, у таблиці результатів для нього не вказували ніяких даних, поки по можливості не повторювали фарбування.

При 0,25 мкг/мл було менше мембранного фарбування в порівнянні з іншими протестованими розведеннями.

Тканина печінки була включена як порівняння між відомим позитивним контролем і тканиною, яка спочатку не була ідентифікована як позитивна.

Значиме фарбування не було ідентифіковано ні в негативному контролі з буфером, ні в контролі ізотипу. Позитивне фарбування в порівнянні з позитивно пофарбованими тканинами було практично виключене, коли ENV-T взаємодіяв з антитілом анти-MSRV/ ENV GnbAC1.

Для подальшої роботи зі скринінгу тестованих Mab використали GNBAC1 при 1,00 р. мл⁻¹ як оптимальна концентрація, при 3,00 р. мл⁻¹ як концентрація на один щабель вище її й 0,25 р. мл⁻¹ як низька концентрація.

У результаті отриманих даних наведена нижче методика ІГХ фарбування була адаптована для скринінгу замороженої нормальній тканини людини.

Методика Час

- Висушування на повітрі
Тканинних зрізів N/A
Фіксація в ацетоні й
висушування на повітрі приблизно 10 хвилин
5 Промивання в проточній
водопровідній воді N/A
0,3 % пероксид водню в метанолі приблизно 10 хвилин
Промивання у водопровідній воді приблизно 5 хв
10 Промивання у ФСБ приблизно 5 хв
Інкубація з моноклональним
антитілом GNBAC1 при 0,25, 1,0 й
3,0 мкг/мл і з контролем ізотипу
при 1,0 мкг/мл протягом ночі при 2-8 °C
Також первісне виключення
15 методики фарбування
і інгібування ENV-T при 10

	Дані мікроскопічного дослідження	ENV-T		GnbAC1			
		10,00	1,00	Ізотип	Концентрація антитіла мкг/мол		
					0,00	0,25	1,00
Молочна залоза	Дуктальний/гландулярний епітелій	0	0	0	Мало +	Трохи ++	Мало +
	Цитоплазма/Мембрана						
	Уміст порожнини	0	0	0	0	Трохи +	Мало +
(карцинома in situ)							
	Поверхня порожнини	0	0	0	0	Трохи ++	Багато ++
	Судини - ендотелій	0	0	0	0	Багато ++	Мало +
	Цитоплазма/Мембрана						
	Дуктальний/гландулярний епітелій	0	0	0	0	Мало +	Багато +++
	Цитоплазма/Мембрана						
	Уміст порожнини	0	Трохи +	Трохи +	Трохи +	Трохи ++	Кілька +++
(аденокарцинома молочної залози)	Поверхня порожнини	0	0	0	0	Мало +	Багато +++
	Судини – ендотелій						
	Цитоплазма/Мембрана	0	0	0	0	Трохи ++	Багато ++
	Дуктальний/гландулярний епітелій	0	0	0	0	Мало +	Кілька ++
	Цитоплазма/Мембрана						
	Уміст порожнини	0	0	0	0	0	0
(аденокарцинома молочної залози)	Поверхня порожнини	0	0	0	0	Трохи +	Більшість в++
	Судини - ендотелій	0	0	0	0	Трохи +	Кілька лько ++
	Цитоплазма/Мембрана						

- мкг/мл з GNBAC1 при 1,0 мкг/мл
20 Промивання у ФСБ приблизно 5 хв
Інкубація з EnVision/HRP приблизно 30 хв
Промивання у ФСБ X2 приблизно 5 хв кожне
Обробка субстратом DAB
ферменту приблизно 5 хв
25 Промивання в проточній
водопровідній воді приблизно 5 хв
Контрастуюче
фарбування в
гематоксиліні Mayers приблизно 15 сек
30 Промивання в проточній

водопровідній воді по необхідності
Зневоднювання, очищення й
заливання в середовище по необхідності
Результати:

5 - Рак молочної залози

Таблиця 15: Результати, одержані із тканинами карциноми молочної залози від різних індивідуумів

ІНТЕНСИВНІСТЬ Негативна 0 Слабка + Помірна ++ Виражена +++

ЧАСТОТА Мало Трохи Багато Більшість

10 Таким чином, одержані дані, що MSRV ENV у високому ступені експресується в дуктальних/гланулярних епітеліальних клітинах й в ендотеліальних клітинах навколишніх кровоносних судин в 3/3 пухлин молочної залози, протестованих специфічним GnbAC1.

Таким чином, відповідно до позначення "MSRV-асоційовані захворювання" тепер одержані дані, що карцинома молочної залози є одним із цих захворювань людини.

15 - Лімфоїдний рак і лімфопрولیферативні розлади

Таблиця 16: Результати, одержані з гіперплазією лімфоїдної тканини від різних індивідуумів

ІНТЕНСИВНІСТЬ Негативна 0 Слабка + Помірна ++ Виражена +++

ЧАСТОТА Мало Трохи Багато Більшість

NP: Практично неможливо

20

Таблиця 16

	Дані мікроскопічного дослідження	ENV-T	Ізотип	Концентрація антитіла мкг/мл GnbAC1
		10,00	1,00	0,00 0,25 1,00 3,00
Мигдалина	Лімфоїдна тканина цитоплазма мембрана	0	0	0 Трохи Багато Трохи +++ +++ +++
	Посудини ендотелій цитоплазма мембрана	0	0	0 Мало Багато Багато ++ ++ +++
(фолікулярна гіперплазія)				
	Лімфоїдна тканина цитоплазма мембрана			Багато Більшість Більшостей +++ +++ +++
	Судини ендотелій цитоплазма мембрана	0	0	0 Мало Багато Багато ++ ++ +++
(фолікулярна гіперплазія)	Лейкоцити в кровоносній посудині цитоплазма мембрана	Багато ++	0	0 NI NI NI

судині
цитоплазма мембрана

25 Таким чином, підтверджено, що MSRV ENV у високому ступені експресується в лімфоїдних клітинах й в ендотеліальних клітинах навколишніх кровоносних судин 2/2 біопсій мигдалин з вираженою гіперплазією від пацієнтів з лімфопрولیферативним розладом при тестуванні з GnbAC1.

30 Таким чином, відповідно до позначення "MSRV-асоційовані захворювання" тепер одержані дані, що лімфопрولیферативні розлади, включаючи раки лімфоїдних клітин, перебувають серед цих захворювань людини.

- Рак нирки

Таблиця 17: Результати, одержані із тканинами карциноми нирки від різних індивідуумів

ІНТЕНСИВНІСТЬ Негативна 0 Слабка + Помірна ++ Виражена +++

ЧАСТОТА Мало Трохи Багато Більшість

35 NP: Практично неможливо

Таблиця 17

	Дані мікроскопічного дослідження	Концентрація антитіла мкг/мл					
		ENV-T	Ізотип	GnbAC1			
		10,00	1,0	0,00	0,25	1,00	3,00
	Поверхня отвору каналців	0	0	0	Мало	Мало	Багато
	Цитоплазма/Мембрана				+	+	+++
	Гломерулярні мезангіальні	0	0	0	0	0	0
Рак нирки	Мембрана/Цитоплазма						
	Гломерулярні петлі судин Ендотелій/Цитоплазма Канальці Поверхня просвіту каналців Цитоплазма/Мембрана Гломерулярні мезангіальні Мембрана/Цитоплазма	0	0	0	Мало +++ Мало + Мало +++	Мало +++ Багато +++ Трохи ++ Мало +++	NI NI Біль з + Кілька ++ Мало +++
Нирково-клітинна карцинома	Капсула Боумена Гломерулярні петлі посудин Ендотелій/Цитоплазма Канальці			Мало +	Мало +	Трохи +++ Багато +++ Мало +	Кілька +++ Біль з +++

Незважаючи на невелике фонове фарбування в одному типі клітин (різному в кожному випадку), аналіз був практично можливий, і, таким чином, можуть бути одержані дані, підтверджуючі, що MSRV ENV у високому ступені експресуються в ниркових клітках й в ендотеліальних клітинах навколишніх кровоносних судин в 2/2 ниркових біопсіях від пацієнтів з раком нирки при тестуванні зі специфічним антитілом анти-MSRV ENV (GnbAC1).

Таким чином, відповідно до позначення "MSRV-асоційовані захворювання" зараз одержані дані, підтверджуючі, що раки нирок є одним із цих захворювань людини.

Відповідні фотографії візуалізації світлової мікроскопії тканинних зрізів, пофарбованих або специфічним антитілом анти-ENV (GnbAC1), або нерелевантним контрольним антитілом (MOPC-21), підтверджують дані, представлені в таблицях 15-17, для раків нирки, для лімфоїдних раків або лімфопроліферативних захворювань і для раку молочної залози.

Приклад 11: А. Білки MSRV ENV й GAG виявляються при значимих і конкордантних рівнях у сироватці деяких гострих випадків діабету, який розвивається

Сироватки від пацієнтів з гострим інсулінозалежним діабетом були анонімно зібрані із залишкових обсягів після рутинного тестування з метою діагностики й наступного спостереження. Сироватки від здорових донорів крові були одержані від організації готового банку крові.

Сироватки тестували відповідно до методики імунологічного визначення, використовуючи планшети з іммобілізованим АРО-Н і специфічне виявлення ліганду, як описано раніше в прикладах даного винаходу.

У таблиці нижче наведена середня оптична щільність на трьох повторях тестів, обмірювана в сироватках від пацієнтів з гострим діабетом (Діаб.) і від репрезентативних донорів крові (ДК).

Використали ліганди, які представляють собою мишаче моноклональне антитіло анти-MSRV:

- Одне антитіло проти оболонки (ENV) GnbAC1 (GeNeuro, Швейцарія).
- Одне антитіло проти поліпротеїну матриксу й капсиду (GAG): 2G5E12 (bioMerieux Франція).

Специфічне зв'язування цих антитіл виявляли за допомогою другого антитіла проти миші (Jackson, США, посилання 115-035-146). Використовували розведення або концентрації зазначені в таблиці нижче.

Результати є значимими, коли відношення (P/N) середньої оптичної щільності, діленої на граничне значення (певне як середнє значення від здорових контролів плюс два стандартних відхилення -SD - відповідної серії), вище одиниці.

Такі значення виділені напівжирним і великим шрифтом в 2 рядах P/N.

Таким чином, можуть бути одержані дані, що десять із вісімнадцяти пацієнтів володіють значимою антигенемією щонайменше по білку ENV, певної за допомогою ліганду, що представляє собою мишаче моноклональне антитіло. Всіх "MSRV-позитивних" пацієнтів визначають за допомогою двох антитіл, і одержані значимі результати для обох білків GAG й ENV.

Такі результати зі співпадаючим визначенням двох різних моноклональних антитіл, спрямованих на два різних епітопи, які представляють два різних білки MSRV (ENV й GAG), є, мабуть, значимими й показовими відносно асоціації з MSRV, як описано в даному винаході в іншому місці, для визначення MSRV-асоційованих захворювань.

Таким чином, діабет типу I або інший діабет, який супроводжується запаленням, включає підгрупу пацієнтів, у яких патогенез захворювання може бути викликаний протизапальними й імунпатогенними ефектами білка MSRV ENV.

Таблиця 18: Результати антигенемії по АРОН-ELISA у пацієнтів з діабетом (Діаб.) у порівнянні зі здоровими донорами (ДК). Див. докладні коментарі в тексті прикладу.

P/N 2 = Відношення оптичної щільності, обчислене як результат для зразка, ділений на граничне значення. Останнє визначають зі здоровими донорами у вигляді середнього здорової групи + два її стандартних відхилення

Таблиця 18

		GnbAC1 1 мкг/мл + Jackson 115-035-146 1/1000	2G5E12 080604CP01 1 мкг/мл + Jackson 115-035146 1/1000
ДІАБ.	MORF	0,061	0,066
	GIRD	0,014	0,020
	THEP	0,085	0,140
	LOND	0,045	0,096
	LEGM	0,030	0,034
	ELAM	0,089	0,085
	NFDK	0,118	0,122
	GEOV	0,088	0,120
	FIOP	0,021	0,052
	VERV	0,026	0,041
	CHOM	0,023	0,047
	HAMH	0,220	0,464
	DJES	0,035	0,040
	PCTP	0,047	0,066
	MEST	0,065	0,062
	HMAA	0,092	0,120
	GIUM	0,046	0,072
	TRAF	0,049	0,049
ДК	GE3	0,025	0,049
	GE4	0,035	0,070
	GE5	0,017	0,037
	GE6	0,027	0,058
	GE7	0,036	0,039
	GE8	0,047	0,054
	MORF	1,172	0,870
	GIRD	0,269	0,264
	THEP	1,633	1,845
	LOND	0,865	1,265
	LEGM	0,576	0,448
	ELAM	1,710	1,120
	NFDK	2,267	1,608
	GEOV	1,691	1,582
P/N2	FIOP	0,404	0,685
	VERV	0,500	0,540

	CHOM	0,442	0,619
	HAMH	4,227	6,116
	DJES	0,673	0,527
	PCTP	0,903	0,870
	MEST	1,249	0,817
	HMAA	1,768	1,582
	GIUM	0,884	0,949
	TRAF	0,942	0,646
	Середнє ДК	0,031	0,051
	SD ДК	0,010	0,012
	Середнє PC	0,064	0,094
	SD MS	0,049	0,099
	Попіг 2SD	0,052	0,078

Приклад 12: Несподіване відкриття підходящої тваринної моделі для ENV-індукованого діабету

1. Введення

5 Спонтанна мутантна модель мишей-діабетиків SCID, не страждаючим ожирінням (NOD-SCID), має мутацію SCID, перенесену на генетичне тіло схильності до діабету NOD. Несподівано попередні експерименти, проведені автором винаходу, виявили, що первинна імунізація гуманізованих мишей NOD-SCID білком ENV (25 мкг) і мишачим MBP (білком і пептидом) систематично приводить до швидкої загибелі всіх тестованих тварин, тоді як всі

10 гуманізовані миші SCID, які одержали ті ж імунотени без білка ENV (помилкові-контрольні), вижили. На першій стадії автори винаходу дозозалежно оцінювали шкідливі ефекти білка ENV у мишей NOD-SCID, використовуючи клінічний моніторинг у сполученні з гістологічним методом. На другій стадії автори винаходу оцінювали корисні ефекти химерного ліганду на основі IgG4 за винаходом при попередженні ушкодження, викликаного білком ENV.

15 2. Оцінка шкідливих ефектів білка ENV у мишей NOD-SCID

a. Матеріали й методи

a.1. Тварини

Шість вільних від патогенів мишей SCID (6-8 тижнів) купували в Charles River, Франція. Тварин утримували по 3 на клітку при стандартному циклі світла й темряви з вільним доступом

20 до їжі й води й не турбували протягом 8-добового періоду акліматизації. Особливу увагу приділяли дуже чистим умовам утримання. Зокрема, тварин утримували в спеціальних клітках, обладнаних кришкою з фільтром.

a.2. Гуманізація мишей NOD-SCID

3 метою одержання мишей NOD-SCID без лімфоїдної імунної системи із щепленою

25 людською імунною системою мишей гуманізували периферичними мононуклеарними клітинами людини, таким чином, забезпечуючи потенціал для дослідження функціональної ролі імунної системи людини в імунотпатогенних моделях тварин. Це дозволяє одержати результати, значно наближені до реальної ситуації в людини у відношенні імунотпатології й відповіді на патогенні білки людини, такі як MSRV-ENV. Гуманізація мишей була досягнута відповідно до раніше

30 описаного протоколу Firouzi et al., 2003 за винятком того, що тварин не опромінювали гамма-випромінюванням і не обробляли лігандом анти-NK, оскільки миші NOD-SCID спонтанно виснажені по NK клітинах. Кров (лейкоцитарно-тромбоцитарний шар, 45-50 мл) від 2 здорових контролів одержували із центра переливання крові (EFS) у Ліоні. Якість і безпека крові була гарантована імунотлогічним і гематотлогічним аналізом. Всі експериментальні процедури

35 проводили під ламінарним потоком повітря й з використанням стерильних рукавичок. Мононуклеарні клітини периферичної крові людини (МКПК) одержували методом поділу в градієнті щільності фіколу й вводили мишам NOD-SCID шляхом і.р. ін'єкції (50.10⁶ клітин). Оскільки для гуманізації всіх тварин використовували кров від двох різних донорів, однакову частку мишей гуманізували від кожного донора крові. У цьому випадку вже можна затверджувати, що

40 ніякого розходження між тваринами, щепленими від кожного донора, не спостерігали у всіх подальших експериментах, як описано нижче.

3. Оцінка шкідливих ефектів білка ENV у мишей NOD-SCID

Ін'єкції білка ENV

На добу 0 (P0) миші одержували однократну внутрішньочеревну (і.р.) ін'єкцію (0,5 мл) білка

45 ENV (PXTherapeutics, Франція) у наступних дозах: 0,1, 1,5, 10 й 20 мкг. Білок ENV був розведений у стерильному фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) (Lonza, Франція). Одна миша одержала ін'єкцію тільки ФСБ.

Щоб уникнути якого-небудь зниження концентрації білка ENV і його біологічної активності проводили другу ін'єкцію білка ENV, емульгованого в 0,5 мл неповного ад'юванта Фрейнда (Sigma, Франція) на Р7. Кожна миша одержала однократну підшкірну ін'єкцію в шию. Дози білка ENV, використовувані для кожної миші, були такими ж, як для першої ін'єкції на добу Р0.

5 Третю s.c. ін'єкцію білка ENV, емульгованого в мінеральному масляному розріджувачі -"IFA"- (0,5 мол) проводили в шию на добу Р14. На ту ж добу миші одержували i.p. ін'єкцію 200 нг (0,5 мл) коклюшного токсину -"PTX"- (Wako, Німеччина) на тварину для тимчасового відкриття гематоенцефалічного бар'єру для проходження імунних кліток поза ЦНС.

Клінічна оцінка

10 Моніторинг загального стану здоров'я (стану шерстного покриву, манери рухів по клітці, пози) і маси тварин проводили 5 днів в тиждень протягом періоду Р14-Р37.

Гістологічне дослідження

Головний мозок і внутрішні органи всіх загиблих тварин витягали й консервували у формаліні (10 %) для наступного гістологічного дослідження.

15 b. Результати

1. Клінічний моніторинг

Протягом перших декількох днів після ін'єкції білка ENV, емульгованого в IFA, і PTX всі миші, які одержали найвищі дози білка ENV, показували зниження маси тіла (див. Фіг. 13), яке супроводжується сильним погіршенням їхнього загального стану здоров'я, на яке вказує низька активність у клітці й поведінка протрації. Нарешті, всі ці миші загинули протягом чотирьох днів після останньої ін'єкції. Цікаво, що миші, ін'єктовані більш низькими дозами білка ENV, проявляли невелике збільшення маси тіла, яке супроводжується гарним загальним станом здоров'я, незважаючи на поступову появу ледве настувборченої вовни у двох інших мишей, низькими дозами білка ENV.

25 Протягом тижня після останньої ін'єкції маса тіла мишей, які вижили, стабілізувалася або злегка знизилася (див. Фіг. 13), але їхній загальний стан здоров'я був незмінним.

Протягом другого тижня після останньої ін'єкції миші, які вижили, продовжували набирати масу (див. Фіг. 13), і їхній загальний стан здоров'я стабілізувався.

2. Гістологічне дослідження

30 Цілі дослідження

Гістопатологічне дослідження підшлункових залоз мишей NOD M4, M5 й M6.

Матеріали й методи

Одержали зразки тканини підшлункової залози, фіксовані у формаліні. Зразки тканини заливали в парафін, різали на зрізи товщиною 5 мкм. Тканинні зрізи фарбували гематоксиліном-еозином-шафраном і досліджували за допомогою світлового мікроскопа. Знімали репрезентативні пронумеровані зображення.

Результати

40 Підшлункова залоза M4: загальна будова підшлункової залози збережена. Присутні осередкові запальні uszkodження: вони утворюють невеликі інфільтрати поліморфного складу при переважно периваскулярном і перидуктальному розподілі. Відсутня значна зміна екзокриної підшлункової залози. Спостерігаються uszkodження ендокринних острівців: запальні клітини присутні паралельно їхньої периферії, і видні апоптичні ендокринні клітини.

45 Підшлункова залоза M5: Є присутнім панкреатит. Більші запальні інфільтрати присутні в межах екзокриної підшлункової залози й супроводжуються осередковим некрозом ацинарних клітин. Іноді є присутнім фібриноідний некроз.

50 Підшлункова залоза M6: Присутні важкі uszkodження. У підшлунковій залозі присутні більші злиті області некрозу й приводять у результаті до повного некрозу великого числа ацинарних клітин. Крім того, у запальні uszkodження також залучена перипанкреатична жирова тканина з вогнищами цитостеатонекрозу. Гістологічний аспект типовий для гострого некротизуючого панкреатиту.

У підсумку:

- Осередкові й слабкі запальні uszkodження в підшлунковій залозі від M4.
- Гострий панкреатит помірної інтенсивності в підшлунковій залозі від M5.
- Важкий гострий некротизуючий панкреатит у підшлунковій залозі від M6.

55 c. Обговорення

60 У цілому результати авторів винаходу дозволяють припустити, що ін'єкція білка ENV летальна в мишей NOD-SCID тільки в дозі вище 5 мкг. Оскільки у тварин, ін'єктованих високими дозами білка ENV, проявлялося погіршення їхнього загального стану здоров'я до ін'єкції білка PTX, малоймовірно, що велике uszkodження ЦНС могло б пояснити шкідливі ефекти білка ENV, спостережувані в мишей NOD-SCID. Більш імовірно, що білок ENV запустив сильну дисфункцію

в одному або в декількох інших органах, яка приводить до загибелі тварин. Оскільки миші NOD-SCID несуть схильне до діабету генетичне тіло, гістологічний стан підшлункової залози загиблих тварин, як представлено вище, у високому ступені дозволяє припустити запалення підшлункової залози, індуковане ENV. Цікаво, що найнижча летальна доза індукує ушкодження тільки в бета-острівцях й ендокринній підшлунковій залозі, яка явно відповідає діабетичним ушкодженням і досить для пояснення загибелі мишей при даній дозі під час відсутності інсулін-секретуючих клітин, знищених ENV-індукованим запаленням.

При більше високих дозах виявляється, що вони, імовірно, перебувають за межами відносних доз на масу, які могли б зустрічатися при діабеті в людини, і що такі високі рівні ENV індукують значно більше запалення, яке захоплює всю підшлункову залозу, включаючи її екзокринну частину, при гострому некротизуючому панкреатиті. Проте, ці спостереження релевантні для панкреатиту, що, як показано в цьому випадку, зустрічається при більше високих ін'єктованих дозах білків MSRV-ENV.

4: Моніторинг глікемії при повторних ін'єкціях білка ENV у мишей NOD-SCID

A. Введення

У попередньому експерименті автори винаходу показали, що повторні підшкірні ін'єкції 5 мкг білка ENV у гуманізованих мишей NOD-SCID можуть привести до загибелі відповідної групи тварин, яка може бути пов'язана з гострим руйнуванням острівців β-клітин підшлункової залози. Щоб запобігти невизначеній інтерпретації розвитку кінетики глікемії при станах, які викликають раптову загибель тварин, у даному дослідженні автори винаходу використали повторні ін'єкції сублетальної дози білку ENV для дослідження глікемії в гуманізованих мишей NOD-SCID.

B. Матеріали й методи

1. Тварини

див. вище 2.а.1

2. Гуманізація мишей NOD-SCID

див. вище 2.а.2

3. Ін'єкції білка ENV

У даному дослідженні мишей ін'єктували один раз у тиждень (P0, P9, P16 й P23) протягом 4 тижнів. На кожен момент часу дві миші одержували підшкірну ін'єкцію в шию 2,5 мкг білки ENV (PXTherapeutics, Франція), емульгованого в 0,5 мл неповного ад'юванта Фрейнда (Sigma, Франція). Дві інші миші (контрольні миші) підшкірну ін'єкцію в шию 0,5 мл неповного ад'юванта Фрейнда.

4. Вимір глікемії

На P0 й P30 збирали зразки крові з латеральної хвостової вени у тварин у свідомості. Концентрації глюкози в крові оцінювали, використовуючи глюкометр (Optium Xceed, Еббот, Франція).

C. Результати

Як очікували при сублетальній дозі, миші, які одержали чотири ін'єкції білку ENV, були ще живі, незважаючи на поступову появу слабко настуворченої шерсті, як описано раніше.

На P0 (доба першої ін'єкції ENV або порожнього розчину в контролях) неможливо було виявити ніякого видимого розходження між контрольними й ENV- ін'єктованими мишами. Цікаво, що на P30 було виявлено, що концентрація глюкози в крові (глікемія) ENV- ін'єктованих мишей була підвищена в порівнянні з контрольними мишами, тоді як у контрольних мишей вона не відрізнялася від колишніх значень при P0 (Фіг. 14).

Виявлено, що ця зміна глікемії в ENV-оброблених тварин досить значима для розвитку в напрямку гіперглікемії в ENV- ін'єктованих тварин, що є характерною ознакою діабету в людини й підтверджує попередні гістопатологічні дані.

Таким чином, ці результати додатково підтверджують експериментальні умови авторів винаходу як релевантну доклінічну модель дослідження ENV-спрямованих терапевтичних лікарських засобів при діабеті.

Приклад 13: Дані за терапевтичним ефектом ліганду GNBAC1 у формі химерного ліганду IgG4 при попередженні захворювання, спадкового діабету, у підходящій тваринній моделі

1. Матеріали й методи

a.1. Тварини

Дане дослідження проводили на двох мишах, які вижили, ін'єктованих низькими дозами білка ENV (0,1 й 1 мкг), використаних у попередньому експерименті.

2. Експериментальні методики

Оскільки показано, що повторна ін'єкція 5 мкг білка ENV приводить до швидкої загибелі миші, автори винаходу використали цю провокаційну дозу для оцінки корисних ефектів ліганду за винаходом. Як описано в попередньому експерименті, миші одержували три s.c. ін'єкції білку

ENV, емульгованого в IFA (0,5 мл), у шию на P50, P57 й P64. На кожен момент часу миші одержували на ту ж добу однократну і.п. ін'єкцію (0,5 мл) 100 мкг химерного ліганду GNBAC1 IgG. Моніторинг клінічного стану й маси кожної миші проводили 5 діб в тиждень від P50 до P81.

3. Результати

Спостереження оброблених тварин аж до 120 доби наступного спостереження чітко показує, що ці тварини мають довгострокове виживання. Таким чином, ін'єкція GnbAC1 захистила їх і дозволила їм вижити при смертельній дозі MSRV-ENV, ін'єктованої три послідовних рази.

Протягом цього періоду спостереження їхній загальний стан здоров'я залишався гарним, і вони продовжували набирати масу у фізіологічному інтервалі (ожиріння не спостерігалось).

Можна зробити висновок, що в даній тваринній моделі, яка підтверджує діабетичні ушкодження й, крім того, які можуть привести до панкреатиту, ліганд GNBAC1 IgG4 ефективний проти смертельних доз MSRV ENV і має терапевтичні ефекти, які цікавлять, при захворюваннях, таких як діабет і панкреатит, обумовлених запаленням й експресією MSRV ENV або антигенемією.

Приклад 14: Схема, конструювання й аналіз in vitro гуманізованого антитіла GNBAC1 з ланцюгами ізотипу IgG4, які містять 6 амінокислотних послідовностей CDR від ліганду, з (i) оптимізаціями на першій стадії вставки в гуманізовані IgG4 варіабельного ланцюга, (ii) відбір кращої комбінації послідовностей CDR для оптимальної єднальної активності мішені (білка ENV) у векторі IgG4 й (iii) вибір оптимізації стабільної експресії IgG4 у клітинах CHO

A. Конструювання молекулярних конструкцій, одержання й відбір конструкцій для одержання гуманізованого й стабілізованого IgG4 вектори антитіла з лігандом

1. Аналізи Fv областей мишачого антитіла GNBAC1 анти-ENV

Для того, щоб знайти підходящі каркасні області людини для гуманізації мишачого антитіла GNBAC1, амінокислотні послідовності Fv областей важкого й легкого ланцюга GNBAC1 вирівнювали з базою даних генів зародкової лінії людських антитіл з Panorama Research Institute (1230 Bordeaux Drive, Sunnyvale, California 94089, США). Були ідентифіковані кращі відповідності генів V зародкової лінії людини як кандидатів гена V людини.

На підставі пошуку в базі даних було ідентифіковано, що гени VH1-46 й VH1-69 людини мають найближчі послідовності до важкого ланцюга мишачого GNBAC1. Таким чином, автори винаходу відібрали ген VH1-69 як каркасні області людини для гуманізації. Використовуючи ту ж базу даних, автори винаходу ідентифікували послідовність JH4 чоловік для використання як каркасна ділянку 4 у гуманізованого важкого ланцюга.

Для легкого ланцюга антитіла VK1-5, VK3-11, VK1-33, VK1-39 показали найвищу гомологію з легким ланцюгом мишачого антитіла. Таким чином, автори винаходу вибрали VK1-39 для гуманізації легкого ланцюга. Використовуючи той же спосіб, автори винаходу ідентифікували JK4 для конструювання каркасної області 4 легкі ланцюги антитіла людини.

Для визначення CDR ділянок, придатних для щеплення на людську VH ланцюг гуманізованого антитіла, автори винаходу повторно оцінили адаптоване й оптимізоване вирівнювання цих CDR ділянок з варіабельною областю важкого ланцюга вихідного мишачого антитіла. Таким чином, автори винаходу використали комбінацію визначення по Кебету й визначення по Чозіа (Johnson G, Wu TT. Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Res 2001; 29: 205-6. and Chothia C, Gelfand I, Kister A. Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. J Mol Biol 1998; 278: 457-79) як краще визначення авторів винаходу. У підсумку, визначення по Чозіа переважно для конформаційної варіабельності, тоді як визначення по Кебету переважно для варіабельності послідовностей. CDR ділянки важкого ланцюга мишачого антитіла GNBAC1 показані на Фіг. 15 (SEQ ID No. 33, 34 й 35) з вибором кращих ділянок для функціональної вставки у варіабельну ділянку важкого ланцюга IgG4 (VH) відповідно до вищеописаного кращого визначення.

Для визначення CDR ділянок, придатних для щеплення на людську VL ланцюг гуманізованого антитіла, автори винаходу також повторно оцінили адаптоване й оптимізоване вирівнювання цих CDR ділянок з варіабельною областю легкого ланцюга вихідного мишачого антитіла. Таким чином, автори винаходу використали комбінацію визначення по Кебету (Johnson G, Wu TT. Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Res 2001; 29: 205-6) і контактне визначення (Panorama Research Institute, CA, USA). Після оцінки для легкого ланцюга мишачого антитіла автори винаходу використали визначення по Кебету як краще визначення авторів винаходу для визначення CDR ділянок. Обрані CDR ділянки для легкого ланцюга антитіла показані на Фіг. 16 (SEQ ID 36 й SEQ ID 38).

2. Гуманізована варіабельна ділянку важкого ланцюга

На основі CDR ділянок мишачого антитіла й гену VH1-69 зародкової лінії людини сім послідовностей VH було сконструйовано для гуманізації важкого ланцюга GNBAC1. Вони були

позначені як H1, H2, H3, H4, H4A, H4B й H4C. Фрагменти ДНК цих V областей синтезували й зливали з 5' кінцем кДНК константної області IgG4 людини з утворенням 7 повнорозмірних важких ланцюгів IgG4. Повнорозмірні важкі ланцюги IgG4 вбудовували в каркас плазмиди pCMV нижче промотору CMV (див. приклад 4). Клон, які містили правильні вставки важкого ланцюга, ідентифікували за допомогою розщеплення ферментами рестрикції, а потім їхньої послідовності ДНК підтвердили шляхом аналізів послідовностей як відповідні SEQ ID No. 39-SEQ ID No. 45 відповідно.

3. Гуманізовані варіабельні області легкого ланцюга

На основі CDR ділянок легкого ланцюга мишачого антитіла й гену VK1-39 зародкової лінії людини було сконструйовано й синтезовано три гуманізованих VL послідовності. Ці послідовності були позначені як VK1, VK2 й VK3. Три фрагменти ДНК VK зливали з константною областю каппа на каркасі плазмиди pTT5, яка містить послідовність каппа-ланцюга людини. Відкрита рамка зчитування кожного легкого ланцюга управляється промотором CMV. З метою підвищення експресії гена послідовність легкого ланцюга каппа також включає інтрон на стику VL і константних областей легкого ланцюга. Плазмідні клони із правильними вставками ідентифікували за допомогою розщеплення ферментами рестрикції, а потім їхньої послідовності ДНК підтвердили шляхом аналізів послідовностей як відповідні SEQ ID No. 46-SEQ ID No. 48.

4. Експресія гуманізованих варіантів антитіл

Для експресії антитіл плазмиди семи важких ланцюгів і трьох легких ланцюгів очищали, використовуючи набір для очищення плазмідної ДНК Maxi (Qiagen). Крім того, плазмиди з химерним важким ланцюгом GNBAC1 IgG4 і химерним легким ланцюгом каппа GNBAC1 (одержані від GeNeuro) очищали, використовуючи той же набір. Клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) культивували в середовищі без сироватки (Invitrogen) в 6-лункових планшетах і котрансфікували різними комбінаціями плазмід важкого й легкого ланцюгів при співвідношенні ДНК 1:1. Трансфекції здійснювали, використовуючи реагент трансфекції Invitrogen freestyle Max. сумарно було проведено 32 трансфекції, які включали комбінації 8 важких ланцюгів (7 гуманізованих важких ланцюгів й однією химерною важкого ланцюга) і чотирьох легких ланцюгів (3 гуманізованих легких ланцюгів й однією химерною легкого ланцюга). На добу 3 після трансфекції збирали надосадові рідини клітинних культур. Концентрації антитіла в надосадових рідинах визначали за допомогою аналізу ELISA IgG4 людини, у якому використали очищене химерне антитіло GNBAC1 IgG4 (яке поставляє фірма GeNeuro) для побудови стандартної кривої.

5. Попередній скринінг варіантів гуманізованих антитіл

Для оцінки варіантів гуманізованих антитіл автори винаходу використали химерне антитіло, утворене в результаті котрансфекції химерної важкої й химерної легкої ланцюгів у клітини CHO, як еталон/позитивного контролю на єднальну активність із білком ENV. Оскільки химерне антитіло GNBAC1 і всі гуманізовані варіанти антитіл перебувають у форматі IgG4, аналіз зв'язування на основі ELISA з іммобілізованим білком MSRV ENV можна зручно використати для оцінки відносних єднальних активностей антитіл. У даному аналізі зв'язування планшети ELISA покривали очищеним рекомбінантним білком ENV (отриманим від фірми GeNeuro) при 1 мкг/мл. Планшети блокували 1 % БСА й наносили в лунки антитіла анти-ENV з різними розведеннями. Зв'язані антитіла визначали за допомогою другого антитіла IgG Fc проти людини, кон'югованого з HRP, з наступним проявом фарбування субстратом HRP (KPL). Використовуючи цей аналіз, автори винаходу показали, що химерне антитіло анти-ENV IgG4 має дуже гарну єднальну активність із іммобілізованим ENV (Фіг. 17).

Використовуючи такий же аналіз зв'язування, автори винаходу оцінювали надосадові рідини, зібрані з культури CHO, що була трансфікована різними комбінаціями гуманізованих важких і легких послідовностей. Для визначення кращого антитіла було встановлено два критерії:

- гуманізоване антитіло повинне мати єднальні активності, близькі до химерного антитіла GNBAC1;

- гуманізоване антитіло повинне мати розумний рівень експресії, тобто більше 100 нг/мл, у надосадових рідинах після котрансфекції плазмід важкого й легкого ланцюга.

На підставі цих критеріїв відбору H2A/K3 було відібрано як краще антитіло завдяки його гарній єднальній активності (Фіг. 18) і експресії (більше 1 мкг/мл в 6-лунковому планшеті). H4A/K3 було другим кращим антитілом, оскільки його єднальна активність із білком ENV нижча, ніж H2A/K3 (Фіг. 19). Третє антитіло, H1/VK3, мало гарну єднальну активність, але слабку експресію антитіла (менш 10 нг/мл в 6-лунковому планшеті) (дані не представлені). На підставі цього попереднього скринінгу автори винаходу вирішили зупинитися на H2/VK3 при подальшій оцінці.

6. Подальша оцінка H2/VK3

Після попереднього скринінгу автори винаходу додатково порівнювали H2/VK3 з химерним антитілом анти-ENV IgG4 в аналізі зв'язування, використовуючи нормалізовані концентрації антитіл. Концентрацію антитіла H2/VK3 у надосадовій рідині ретельно вимірювали за допомогою IgG4 ELISA авторів винаходу, використовуючи очищене химерне антитіло GNbAC1 як стандарт. Антитіло H2/VK3 у надосадових рідинах й очищене химерне антитіло GNbAC1 IgG4 розводили до однакових концентрацій і порівнювали в ENV-єднальному аналізі ELISA. Аналіз показав, що гуманізоване антитіло H2/VK3 мало майже ідентичну ENV-єднальну активність із химерним антитілом IgG4 анти-ENV (Фіг. 20).

Потім автори винаходу підвищували експресію H2/VK3, так щоб можна було очистити достатню кількість антитіла H2A/K3. Плазмиди pCMV H2 й pTT5 VK3 були одержані з використанням набору для очищення плазмід Maxi (Qiagen). Клітки CHO культивували в середовищі CHO без сироватки й трансфікували двома плазмідами, використовуючи реагент трансфекції Invitrogen Freestyle Max. Через п'ять діб після трансфекції надосадові рідини клітинних культур збирали й центрифугували при 3400 об/хв протягом 15 хвилин. Потім надосадові рідини пропускали через стовпчик з білком A (GE), промивали ФСБ й елюїрували буфером для елюїрування pH 3,5. Фракції, які містять білок, поєднували й концентрували до відповідного обсягу за допомогою спін-стовпчиків Amicon з відсіканням молекулярної маси 10 кДа. Концентрації антитіла визначали за допомогою ELISA з IgG4 людини і підтверджували аналізом білка за Бредфордом (Bio-Rad). Очищене антитіло H2A/K3 перевіряли в невідновлюючому ДСН-ПААГ електрофорезі й спостерігали єдину смугу молекулярної маси приблизно 150 кДа (Фіг. 21).

Нарешті, очищене H2/VK3 порівнювали з очищеним химерним антитілом GNbAC1 в ENV-єднальному аналізі. Результати показали, що очищене H2A/K3 має єднальну активність, майже ідентичної очищеному химерному антитілу (Фіг. 22). На підставі цих даних автори винаходи зробили висновок, що H2/VK3 відповідає їхнім критеріям, і воно було обрано в якості гуманізованого антитіла GNbAC1. З урахуванням попередніх даних по єднальній активності (Фіг. 3-6 й 8) 6 послідовностей CDR, необхідних для збереження активності ліганду в гуманізованому антитілі, вбудовані в амінокислотні послідовності ланцюгів H2 й VK3 обраного гуманізованого IgG4 вектора антитіла (фіг. 22) і представлені в SEQ ID No. 49-SEQ ID No. 54.

Ці послідовності оптимізовані шляхом відбору й мутації із проаналізованих послідовностей CDR у мишачих VH й VL ланцюгах, які були спочатку обрані для адекватного вбудовування в первинні конструкції людських VH і людських VL (SEQ ID 33-38). Амінокислотні послідовності для обраного гуманізованого важкого ланцюга H2 і легкого ланцюга VK3 (для відібраної гуманізованої конструкції IgG4) і їх мишачі залишки, які залишилися, також показані на фіг. 23.

Автори винаходу одержали 1 мг повнорозмірної конструкції гуманізованого антитіла H2/VK3 із клітин CHO шляхом котрансфекції плазмід pCMV H2 й pTT5 VK3 у середовищі CHO без сироватки, і це антитіло H2A/K3 було очищено за допомогою стовпчика з білком A.

7. Створення гуманізованого анти-ENV mAb з мутацією S241P

Виявлено, що антитіла IgG4 іноді є функціонально моновалентними *in vivo*. Недавні дослідження пояснили, що це є наслідком обміну *in vivo* половинними молекулами IgG (однієї H й однієї L ланцюга) серед молекул IgG4. Цей процес приводить у результаті до біспецифічних антитіл, які в більшості ситуацій поведуться як функціонально моновалентні антитіла (Aalberse and Schuurman 2002, Ig4 breaking the rules, Immunology. 2002, 105:9-19). Це викликано по більшій частині нестабільністю міжланцюгових дисульфідних містків за рахунок заміни P на S у положенні залишку 241 (шарнірна ділянку) і, імовірно, знизить специфічність й ефективність антитіла. Щоб уникнути цієї проблеми автори винаходу здійснили 3D оцінку білка на можливу амінокислотну заміну (використовуючи програмні забезпечення, такі як доступні на сайті www.NCBI-ENTREZ, наприклад, візуалізатор Protein Cn3D, або такі як M CLC Main Workbench, CLC Bio company, Орхус, Данія, або розроблені в Panorama Research Institute, CA, США). Тому автори винаходу думають, що вихідна модифікація первинної нуклеотидної послідовності, яка полягає в заміні існуючого залишку серину (S) у положенні 241 залишком проліну (P) оптимізованої нуклеотидної послідовності, яка кодує їх, усередині нуклеотидної конструкції є рішенням проблеми можливої нестабільності вектора антитіла IgG4 з лігандом. Отже, був проведений сайт-спрямований мутагенез, і продукт ПЦР був клонований у плазміді pCMV, позначеної як H2 S241P. Послідовність ДНК мутантного важкого ланцюга H2 була підтверджена аналізом послідовності.

Тепер дану оптимізацію об'єднали з модифікацією послідовності легкого ланцюга каппа включенням інтрону на стику VL і константних областей легкого ланцюга, як уже згадано вище, для підвищення експресії гену.

Ця оригінальна комбінація послідовностей, оптимізованих з раніше відібраних клонів шляхом нуклеотидних мутацій або інсерцій із впливом на первинну амінокислотну структуру або на швидкість продукування кінцевого продукту, показана на Фіг. 24, при якій послідовності, які відповідають продукту антитіла IgG4 з амінокислотним складом і властивої йому структурою, забезпечують оптимізований, стабільний і вектор, який високо експресує для ліганду за даним винаходом, який зберігає його єднальні властивості з антигеном-мішенню, який представляє собою білок ENV. Показано кінцеві послідовності важкого ланцюга гуманізованого антитіла анти-ENV H2 S241P з її кодуючою нуклеотидною послідовністю (SEQ ID 55) і її амінокислотною послідовністю (SEQ ID 56). Також показані кінцеві послідовності легкого ланцюга гуманізованого антитіла анти-ENV VK3 з її кодуючою нуклеотидною послідовністю (SEQ ID 57), у якій інтрон підкреслять: (SEQ ID 58). Далі треба сплайсована нуклеотидна послідовність легкого ланцюга VK3 без інтрону (SEQ ID 59). Останньою показана кодуюча амінокислотна послідовність, яка відповідає кінцевій оптимізованого легкого ланцюга VK3 (SEQ ID 60).

Нарешті, автори винаходу одержали 2 мг кінцевого варіанту гуманізованого антитіла з мутацією S241P із клітин CHO. Плазмідні рCMV H2 S241P й рTT5 VK3 очищали за допомогою набору для плазмідної ДНК Qiagen Maxi. Клітини CHO культивували в середовищі CHO без сироватки й трансфікували плазмідами рCMV H2 S241P й рTT5 VK3, використовуючи реагент трансфекції Freestyle Max (Invitrogen).

Через 5 діб надосадові рідини клітинних культур збирали й центрифугували при 3400 об/хв протягом 15 хвилин. Білок антитіла очищали, використовуючи стовпчик з білком А (GE).

В. Амінокислотна й нуклеотидна послідовність, оптимізована для експресії в клітинах CHO векторів химерного й гуманізованого антитіла IgG4 з лігандом

В1. Білкова й оптимізована по кодонах (для експресії в клітинах CHO) нуклеотидна послідовність химерного й гуманізованого варіанта антитіла mAb GnbAC1

В1.1 Химерне GnbAC1

Послідовність, яка відповідає зрілому білку chGNbAC1 IgG4, представлена в SEQ ID 61.

Послідовність, яка відповідає зрілому білку chGNbAC1 LC, представлена в SEQ ID 62.

В1.2 Гуманізоване GnbAC1

Відповідна послідовність зрілого білка huGNbAC1 IgG4 представлена в SEQ ID 63.

Відповідна послідовність зрілого білка huGNbAC1 LC представлена в SEQ ID 64.

В2. Нуклеотидні послідовності легкого й важкого ланцюга GNbAC1, включаючи плазмідні послідовності

Нуклеотидні послідовності huGNbAC1 LC представлені в SEQ ID 65.

Нуклеотидні послідовності huGNb AC1 IgG4 HC представлені в SEQ ID 67.

С. Комплементарні аналізи in vitro єднальної активності відібраного гуманізованого IgG4 ліганду (стабілізованого й оптимізованого по кодонах вектора гуманізованого антитіла IgG4)

С1. Біохімічні аналізи зв'язування антитіла

Протокол:

- Інкубація 2 г при 37 °C ENV у бікарбонатном буфері 50 мМ р 9,6

- Виявлення антитілами, розведеними у ФСБ БСА 1 %, протягом 1 г при кімнатній температурі

- Виявлення другим антитілом проти миші й проти людини, міченими пероксидазою, відповідно (посилання 115-035-146 і посилання 109-035-088, Jackson, США), розведеними 1/1000 у ФСБ БСА 1 % й інкубуваннями протягом 1 г при кімнатній температурі Прояв здійснюють шляхом додавання субстрату OPD і зчитування оптичної щільності спектрофотометром через 30 хв (Стадії відмивання ФСБ проводять перед кожною стадією).

- Таблиця 19: Кінетика зв'язування по системі доза-відповідь гуманізованого антитіла GNbAC1 з білком-мішенню MSRV-ENV

Таблиця 19

		ENV-T 7A 1 мкг/мол					
		проти людини 109-035-088 Jackson 1/1000 або проти миші 115-035-146 Jackson 1/1000					
		HuMAb GNBAC 1 Эксп. №1	HuMAb GNBAC1 Эксп. №2	GnbAC1 мишаче SQ08AK111	GnbAC1 Ig1 химерне Polymun партія 3	GnbAC1 Ig4 химерне Polymun партія 3	2G5E12 мишаче
Концентрація MAbs [мкг/мл]		2,583	2,454	2,001	2,539	2,375	0,114
	0,5	2,458	2,694	1,854	2,54	2,493	0,041
	0,25	2,141	2,248	1,211	2,638	2,166	0,04
	0,125	1,848	1,897	0,945	2,442	1,806	0,043
	0,0625	1,316	1,578	0,585	2,508	1,66	0,041
	0,03125	0,729	0,894	0,406	1,979	1,259	0,073
	0,0156	0,501	0,52	0,166	1,274	0,777	0,042
	0,0078	0,286	0,324	0,13	0,85	0,474	0,043

		MAb 1 мкг/мол					
		проти людини 109-035-088 Jackson 1/1000 або проти миші 115-035-146 Jackson 1/1000					
		HuMAb GNBAC 1 Эксп. №1	HuMAb GNBAC1 Эксп. №2	GnbAC1 мишаче SQ08AK111	GnbAC1 IgG1 химерне Polymun партія 3	GnbAC1 IgG4 химерное Polymun партія 3	2G5E12 мишаче 080604CP01
Концентрація ENV [мкг/мл]	1	2,576	2,602	2,221	2,519	2,67	0,053
	0,5	2,501	2,346	1,867	2,533	2,26	0,084
	0,25	2,183	1,719	1,418	2,273	2,296	0,087
	0,125	1,728	1,48	0,975	1,822	1,558	0,093
	0,0625	1,27	1,4	0,837	1,855	1,548	0,081
	0,03125	0,907	0,703	0,367	1,6	1,095	0,091
	0,0156	0,547	0,403	0,186	0,888	0,71	0,09
	0,0078	0,36	0,211	0,111	0,642	0,313	0,082

Ці результати чітко показують, що гуманізоване антитіло IgG4 у двох експериментах має відтворену кінетику доза-відповідь як з фіксованим білком-мішенню ENV і серійними розведеннями антитіла (верхня частина таблиці), так і з фіксованою концентрацією антитіла й розведеннями білки-мішені (нижня частина таблиці). Вони еквівалентні такими для химерного антитіла того ж ізотипу, але набагато краще, ніж для вихідного антитіла GNBAC1, тоді як ніякої значимої кінетики зв'язування не спостерігали для нерелевантного контрольного антитіла (2G5E12).

C2. Тест на реактивність МКПК

Матеріали й методи: Див. Приклад 6.

Таблиця 20. Інгібування протизапальних цитокінів IL-6 й IFN-γ у культурах МКПК із білком MSRV ENV лігандом GNBAC1, убудованим як в, гуманізований, так і у химерний вектор антитіла IgG4. NB. Фоновий сигнал без ENV показаний нижче (без ENV), і контрольна позитивна індукція бактеріальним LPS показана внизу.

Таблиця 20

		IL-6	IFN-g
Білки	MAb (відношення 10/1)	24 ч	72 ч
ENV (EN-T10A 0,1 мкг/мл)	Без антитіла	4363	-
	Hu-GNbAC1 №1	2910	-
	GNbAC1 chim IgG4 партія 3	2274	-
ENV (ENV-SU 4A 0,5 мкг/мл)	Без антитіла	-	336
	Hu-GNbAC1 №1	-	46
	GNbAC1 chim IgG4 партія 3-	-	384
Без ENV		695	13
LPS	-	26039	212

Ці результати свідчать про значне інгібування:

(i) Індукція інтерлейкіна 6 (IL-6) білком MSR/V ENV, яка має пік при 24 г у клітинних культурах периферичних мононуклеарних клітин (з повнорозмірним білком ENV, ENV-T, використовуваним при 0,1 мкг/мл), значно інгібується в присутності як гуманізованих, так і химерних антитіл.

(ii) Індукція інтерферону гама (IFN-γ) білком MSR/V ENV, який має пік при 72 г у клітинних культурах периферичних мононуклеарних клітин (з поверхневим фрагментом білка ENV, ENV-SU, використовуваним при 0,5 мкг/мл), сильно інгібується в присутності гуманізованого антитіла, але не в присутності химерного антитіла. Це свідчить, таким чином, про поліпшений ефект гуманізованого антитіла на Т-клітинну активацію в порівнянні з химерним антитілом. В останньому химерном векторі ланцюги, які залишилися, VH й VL миші можуть викликати шкідливу імунну активацію за допомогою розпізнавання Т-клітками людини ксеноантигенів (білкових ланцюгів миші, щеплених у каркасну ділянку). Цього не відбувається з відібраним гуманізованим вектором IgG4 ліганду, який зв'язується з білками ENV. Це розходження не спостерігають із IL-6 при 24 г, оскільки він не залучений у специфічне розпізнавання антигену (придбаний імунітет з Т-лімфоцитами), а тільки в активацію вродженого імунітету, блоковану лігандом при зв'язуванні з імунопатогенними білками-мішенями ENV.

Приклад 15: Як білки оболонки HERV-W із хромосоми 7q (сінцитин), так і частки MSR/V індують протизапальні відповіді на імунних клітинах й астроцитах, які інгібуються антитілом анти-MSR/V-ENV GNbAC1 і його химерною конструкцією IgG4 з лігандом

Взаємини між імунопатогенними ознаками в людей і біологічним ефектом цих білків ENV підвищено. Оскільки послідовності MSR/V-ENV і сінцитину мають більше 81 % ідентичності послідовності (Mallet, Bouton et al. 2004; Mameli, Astone et al. 2007), автори винаходу досліджували, чи можуть ці два сестринних білки проявляти подібні протизапальні ефекти. Оскільки попередні дослідження на мононуклеарних клітинах периферичної крові (МКПК) і астроцитах головного мозку показали реактивність як на MSR/V-ENV, так і на сінцитин відповідно, автори винаходу в цьому випадку провели паралельний аналіз на обох типах клітин.

Методи

Одержання й виділення білків

Див. Приклад 2.

Виділення й одержання клітин

МКПК людини виділяли з лейкоцитомоцитарних шарів здорових донорів (Центр переливання крові - HUG - Женева) центрифугуванням у градієнті щільності через середовище фіколл-пак. Астроцити людини замовляли у фірмі InVivogen.

Стимуляція клітин

МКПК висівали в 24 або 48-лункові планшети при концентрації 1×10^6 /лунка в 1 мл середовища, яке складається з RPMI Glutamax 1640 (Invitrogen) з додаванням 1 % неесенціальних амінокислот, 1 % пеніциліну/стрептоміцину, 1 % пірувату натрію й 10 % інактивованої нагріванням ФСТ (BioWest). Клітини інкубували при 37 °C в 5 % CO₂ у зволоженій атмосфері протягом 24, 48 або 72 г.

Для експериментів на культурах клітин сінцитин, MSRV-ENV й LPS попередньо інкубували в 100 мкл середовища з антитілами, спрямованими проти ENV (GNbAC1 моноклональне IgG миші, GeNeuro), протягом 1 г при 4°, після чого додавали до клітин.

Аналізи продукування цитокінів

- 5 Надосадові рідини клітинних культур збирали при 24, 48 або 72 г і зберігали при -20 °C до оцінки продукування цитокінів за допомогою ELISA. Для визначення цитокінів людини використали набір OptEIA ELISA від DC Bioscience відповідно до інструкцій виробника.

Результати

MSRV-ENV і сінцитин є HERV-W-родинними білками

- 10 З метою порівняння біологічних властивостей, пов'язаних з білком оболонки HERV-W сінцитином (номер доступу NCBI AF072056.2), із властивостями MSRV-ENV (номер доступу NCBI AF331500.1) для даного дослідження автори винаходу експресували й продукували ці два білки в подібних умовах (умови описані в Прикладі 2).

- 15 Для адресації й порівняння біологічних ефектів двох білків, родинних HERV-W, автори винаходу досліджували їхній ефект при індукції протизапальних цитокінів. Автори винаходу виявили, що стимуляція білків, споріднених HERV-W ENV, приводила до сильної підвищувальної регуляції протизапальних відповідей інтерлейкіна 6 (IL-6) астроцитів. Важливіше всього, що на цю стимуляцію не впливало нерелевантне антитіло (не зв'язане з жодним ENV), але вона була сильно інгібована мишачим антитілом GNbAC1 і химерним антитілом GNbAC1 IgG4 людини, яка явно демонструє, що ліганд за винаходом в будь-яких формах вектора антитіла інгібує протизапальні ефекти споріднених варіантів HERV-W ENV, а не тільки MSRV-ENV.

- 20 На Фіг. 24 приклад цього аналогічного біологічного ефекту виявлений на підставі дози вивільнення IL-6 у надосадовій рідині культури в присутності кожного білка, спорідненого HERV-W ENV. Цей ефект є специфічним, оскільки також інгібується лігандом GNbAC1 у формі мишачого або IgG4 химерного антитіла. За допомогою цього також одержані дані про подібну ефективність інгібування ліганду на різних білках, споріднених HERV-W ENV.

- 25 Крім астроцитів, які залучені в локальні ушкодження головного мозку й запалення, автори винаходу показали системні імунні відповіді як MSRV-ENV, так і сінцитину, які стимулюють продукування протизапальних цитокінів у культурах мононуклеарних клітин периферичної крові людини (МКПК, тобто лімфоцитів і моноцитів).

- 30 На Фіг. 25 приклад цього аналогічного біологічного ефекту на МКПК підтверджений виявленням IL-12 P40 (характерного для вродженої імунної відповіді), а також підтверджений вивільненням однакової дози IL-6 у надосадовій рідині культури для обох білків, споріднених HERV-W ENV. Крім того, як для експерименту з астроцитами, це вивільнення IL-6 також специфічно інгібується лігандом GNbAC1 у формі мишачого або IgG4 химерного антитіла.

- 35 Приклад 16: Ліганд GNbAC1, рекомбінантне химерне антитіло IgG4 людини - GNbAC1 і гуманізоване антитіло IgG4, яке містить ліганд, зв'язуються з білками MSRV-ENV й HERV-W ENV 7q/сінцитин із глікозилуванням клітин людини

- 40 1. Матеріали й методи

a. Бактеріальний рекомбінантний білок ENV був отриманий, як описано в прикладі 2.

b. Глікозилований білок MSRV ENV людини був виготовлений фірмою GeNeuro, P' therapeutics, Гренобль, Франція, відповідно до наведеної нижче методики: білок, аналогічний HERV-W-ENV, називаний сінцитин, продукували відповідно до того ж протоколу.

- 45 Спосіб одержання глікозилізованого очищеного білка ENV експресією в клітинах людини

Трансфекція

Клітини HEK-Freestyle висівали при 10^6 клітин/мл і трансфікували Env-MSRV_pMCMVHE/1, використовуючи реагент трансфекції 293Fectin.

Збір і лізис

- 50 Через три доби після трансфекції клітини збирали й центрифугували. Осад клітин ресуспендували в буфері лізису (ФСБ із додаванням інгібіторів протеаз), і руйнування клітин здійснювали шляхом обробки ультразвуком.

Солюбілізація

- 55 Після центрифугування осад ресуспендували в буфері солюбілізації (50 мМ Tris р 8, 100мМ NaCl, 2 М сечовина, 2 % FOS-холін 10) і солюбілізували протягом ночі при +4 °C при перемішуванні.

Розведення перед очищенням

На наступну добу солюбілізований білок розводили в 4 рази в буфері розведення (50 мМ Tris р 8, 100 мМ NaCl) і гомогенізували перед очищенням.

- 60 Пул 1 EnvMSRV His-мітка Спосіб очищення: Афинна хроматографія на Ni-сефарозе

Афінну хроматографію на Ni-сефарозі (GE Healthcare, 4 мл) проводять для очищення His-міченого Env-MSRV.

Буфер зрівноважування: 50 мм Tris р 8, 100 мм NaCl, 0,5 % FOS-холін 10, 0,5 М сечовина.

Буфер елювання: 50 мм Tris р 8, 100 мм NaCl, 0,5 % FOS-холін 10, 0,5 М сечовина, 1 М імідазол.

Стадія елювання: градієнт на 30 CV (обсягів стовпчика) від 0 % до 100 % буфера елювання.

Концентрування пулу: 7-кратна з використанням Amicon з відсіканням 30 кДа

Пул 2 EnvMSRV His-мітка Спосіб очищення: Афінна хроматографія на Ni-сефарозе

Цю другу афінну хроматографію проводили, використовуючи проточну фракцію першої як вихідний матеріал = нанесення, розведення до 50 мм Tris р 8, 100 мм NaCl, 0,2 % FOS-холін 10, 0,5 М сечовина

Буфер зрівноважування: 50 мм Tris р 8, 100 мм NaCl, 0,2 % FOS-холін 10, 0,5 М сечовина.

Буфер елювання: 50 мм Tris р 8, 100 мм NaCl, 0,2 % FOS-холін 10, 0,5 М сечовина, 1 М імідазол.

Стадія елювання: градієнт на 30 CV від 0 % до 100 % буфера елювання.

Контроль якості:

Для аналізу на контроль якості проводили електрофоріз у ДСН-ПААГ з наступним фарбуванням Кумаси синім і Вестерн-блот-аналізом, використовуючи мишаче антитіло GNbAC1. N-кінцеве секвенірування підтвердило ідентичність очищеного білка.

Діаліз і заморожування партій

Дві партії Env-MSRV піддавали діалізу проти 50 мм Tris р 8, 100 мм NaCl, 0,5 % або 0,2 % FOS-холін 10, після чого додавали 10 % гліцерину й заморожували в рідкому азоті.

с. Визначення специфічного зв'язування тестом ELISA

Всі препарати ENV розводили в буфері CaCO₂ 50 мМ р 9,6; препарати інкубували в лунках мікропланшетів Elisa протягом 2 г 37 °С для покриття білком мікропланшетів ELISA. Проте, внаслідок більш низького виходу продуктування, концентрація іммобілізованого сінцитину була нижча, як така для MSRV-ENV.

Ідентифікуючі антитіла розводили у ФСБ БСА 1 % й інкубували протягом 1 г при кімнатній температурі в трьох повторях лунок мікропланшету. Мічене пероксидазою друге антитіло проти миші для мишачого моноклонального (посилання 115-035-14) і друге антитіло проти людини для гуманізованих і людських - химерних рекомбінантів (посилання 115-035-088) розводили 1/1000 у буфері ФСБ БСА 1 % й інкубували протягом 1 г при кімнатній температурі. Прояв OPD для пероксидази проводили протягом 30 хв із наступним зчитуванням оптичної щільності при 490 нм. Відмивання перед кожною стадією інкубації проводили при 4, 4 й 6 циклах відмивання відповідно.

2. Результати

Як видно з Фіг. 26 нижче, очищені білкові препарати MSRV-ENV, як бактеріальні, так і з людським типом глікозильовання, легко визначалися всіма типами антитіл з лігандом (мишачим, химерним і гуманізованим), даючи гарний сигнал при люмінометричних вимірах оптичної щільності. Цікаво, що в даних умовах ELISA тільки гуманізоване антитіло GNbAC1 з лігандом забезпечувало гарне розпізнавання людського глікозильованого сінцитину, тоді як при даній концентрації покриття мишаче й химерне антитіла давали низькі сигнали із сінцитином.

Ці результати чітко показують, що для ліганду за даним винаходом, незалежно від його використовуваного молекулярного вектора для зв'язування з епітопом-мішенню (мишачого, химерного IgG4 або гуманізованого IgG4 антитіла), виявлене ефективне зв'язування з усіма формами білків-мішеней, які містять епітоп, тобто з білками ENV як бактеріального, так і людського типу глікозильовання, і особливо з гуманізованим антитілом, як HERV-W-родинних білків, так і білка MSRV-ENV й HERV-W 7q ENV, також називаного сінцитином.

Таким чином, терапевтичний ліганд зв'язується з людськими глікозильованими формами білка-мішені ENV.

Приклад 17: Аналіз in vivo химерного антитіла GNbAC1 ізотипу IgG4 на терапевтичний ефект у тваринній моделі шизофренічних аномалій поведінки, індукованих MSRV ENV

І. Введення

У Прикладі 8 автори винаходу продемонстрували присутність білка MSRV-ENV у сироватці пацієнтів із шизофренією. Цей результат підкреслює необхідність у дослідженні взаємин між присутністю білка ENV і виникненням змін у головному мозку й порушень поведінки в адекватних тваринних моделях. Теорії шизофренії, пов'язані з розвитком нервової системи, постулюють, що це захворювання є поведінковим проявом первинного інсульту задовго до клінічного прояву цього захворювання (Weinberger and Lipska, 1995; Lewis and Levitt, 2002).

Таким чином, дану патофізіологічну ознаку варто брати до уваги при розробці відповідних тваринних моделей, які імітують розлади, пов'язані із шизофренією.

II. Експеримент 1: Ефект химерного антитіла IgG4 на поведінкові й анатомічні зміни після повторної однобічної інтрацеребровентрикулярної ін'єкції білка ENV пацюкам, які одержали ENV-індуковане імунне примірування в ранньому дорослому стані

A. Матеріали й методи

1. Тварини

Самців пацюків лінії Спраг-Дулі (6-8-тижневого віку) (n=8) купували в Charles River, Франція. Тварин розміщували по 3 на клітку при стандартному циклі світла й темряви з вільним доступом до їжі й води й не турбували протягом 8-добового періоду акліматизації. Всі процедури погоджені з Директивою Ради Європейських співтовариств від 24 листопада 1986 (86/609/EEC) і Директивою Національної Ради від 19 жовтня 1987 (87848, "Ministere de l'Agriculture et de la Foret", Франція). Додавали всі зусилля до мінімізації числа використовуваних тварин й їхніх страждань.

2. ENV-індуковане імунне примірування

На першу добу, названі "моментом 0" (P0), пацюків випадковим чином визначали в фальшиво-ін'єктовану групу (n=2) з ін'єкцією фосфатно-сольового буферного розчину (ФСБ) (Lonza, Франція) і ENV-ін'єктовану групу (n=6) з ін'єкцією 250 нг рекомбінантного білка ENV (His-ENVT-081206-1, PXT therapeutics, Франція), розчиненого у ФСБ.

Кожного пацюка анестезували і.р. введенням змішаного розчину ксилазіну 10 мг/кг (Rompun®, Alcyon, Франція) і кетаміу 80 мг/кг (Imalgene®, Alcyon, Франція). Вовну обрізали в області, яка поширюється від проміжку між вухами до області безпосередньо перед очима. Вставляли вушні пробки, і тваринну фіксували в стереотаксичному інструменті із пластинкою верхніх різців на 5 мм вище внутрівушній лінії. Вистрижену ділянку скальпа промокали антисептичним розчином на основі хлоргексидину (Alcyon, Франція) і робили розріз від проміжку між вухами до крапки між очима. Шкіру відводили ножицями, і нижчележачу тканину, включаючи періост, видаляли, щоб оголити чисту, суху ділянку черепа (приблизно 15 × 18 мм).

Пластмасова канюля (o.d. = 0,457 мм й i.d. = 0,267 мм) (Plastic One, USA) була призначена для імплантації в правий бічний шлуночок. Канюлю монтували в стереотаксичному інструменті, нульове положення наконечника встановлювали на брегмі. Просвердлювали отвір у черепі над бічним шлуночком (переднє-заднє, 0,92 мм; медіально-латеральне, ± 1,7 мм відносно брегми). Крапку канюлі поміщали над центральним отвором, так щоб наконечник перебував на одному рівні з поверхнею черепа. Канюлю опускали на 3,5 мм через кору головного мозку в бічний шлуночок.

Для кожного пацюка ін'єкцію одного ФСБ або білка ENV здійснювали за допомогою ін'єктору з нержавіючої сталі, поміщеного в канюлю й просунутого на 0,5 мм нижче наконечника канюлі. Ін'єктор був з'єднаний поліетиленовою трубкою зі шприцом Гамільтона (VWR, Франція) для ручної подачі розчинів за 3-хвилинний період. Ін'єктор витягали через 3 хв після завершення упорскування, щоб запобігти витоку ФСБ або білка ENV слідом за ін'єктором.

Рану закривали, використовуючи хірургічну нитку на голкотримачі. Тварині давали можливість відновитися в індивідуальній клітці протягом 2-добового періоду. Потім тварин випадковим чином поміщали по трьох на клітку й не турбували протягом подальших експериментів.

3. Повторна однобічна інтрацеребровентрикулярна ін'єкція білка ENV після латентного періоду

Через вісім місяців всім пацюкам імплантували краніальні канюлі, які дають можливість повторних інтрацеребровентрикулярних (icv) ін'єкцій.

На добу операції (P0) кожного пацюка анестезували і.р. введенням змішаного розчину ксилазіну 10 мг/кг (Rompun®, Alcyon, Франція) і кетаміну 80 мг/кг (Imalgene®, Alcyon, Франція). Вовну обрізали в області, яка поширюється від проміжку між вухами до області безпосередньо перед очима. Вставляли вушні пробки, і тваринну фіксували в стереотаксичному інструменті із пластинкою верхніх різців на 5 мм вище внутрішньовушній лінії. Вистрижену ділянку скальпу промокали антисептичним розчином на основі хлоргексидину (Alcyon, Франція) і робили розріз від проміжку між вухами до місця між очима. Шкіру відводили ножицями, і нищележачу тканину, включаючи періост, видаляли, щоб оголити чисту, суху ділянку черепа (приблизно 15 × 18 мм). Просвердлювали три отвори, два приблизно на 7 мм назад від брегми на обох сторонах черепа, правої й лівої, а третє на 7 мм назад від брегми. Нейлонові гвинти (діаметр = 0,50 мм) (Plastic One, США) угвинчували, щоб вони точно входили в отвори, і вони служили як якорі для зубного цементу. При цих процедурах приділяли увагу збереженню твердої мозкової оболонки. Пластмасова канюля (o.d. = 0,457 мм й i.d. = 0,267 мм) (Plastic One, USA) була призначена для

імплантації в правий бічний шлуночок. Канюлю монтували в стереотаксичному інструменті, нульове положення наконечника встановлювали на брегмі й відзначали крапку на 0,92 мм назад й на 1,7 мм убік від нульової поділки. У цьому відзначеному місці робили отвір за допомогою бору. Крапку канюлі розташовували над центральним отвором, так щоб наконечник перебував на одному рівні з поверхнею черепа. Канюлю опускали на 3,5 мм через кору головного мозку в бічний шлуночок. При втриманні канюлі в затискному пристосуванні стереотаксичного інструменту невелика кількість зубного ущільнювача (Paladur®, Heraeus Kulzer, Франція) вводили навколо канюлі і якірних гвинтів. Рану закривали, використовуючи хірургічну нитку на голкотримачі. Закріплюючи голку витягали, коли зубний матеріал тверднув, і тварину можна була витягти зі стереотаксичного апарату.

Ін'єкції ФСБ або білка ENV здійснювали на ту ж добу (P0) і на 25 добу (P25) після імплантації краніальних канюль.

Для кожного моменту часу один ФСБ або 250 нг рекомбінантного білка ENV (His-ENVT-081206-1, PXTherapeutics, Франція) за допомогою ін'єктора з нержавіючої сталі, поміщеного в канюлю й просунутого на 0,5 мм нижче наконечника канюлі. Ін'єктор був з'єднаний поліетиленовою трубкою зі шприцом Гамільтона (VWR, Франція) для ручної подачі розчинів за 3-хвилинний період. Ін'єктор витягали через 3 хв після завершення упорскування, щоб запобігти витоку ФСБ або білка ENV слідом за ін'єктором.

4. Системне введення химерного антитіла IgG4

На добу після другої бустер-ін'єкції білка ENV (P26) ENV-ін'єктованих пацюків випадковим чином відбирали для одержання однократної внутрішньочеревної ін'єкції (i.p.) ФСБ (n=3) або 100 мкг химерного антитіла IgG4, розведеного у ФСБ (n=3).

5. Магнітно-резонансна візуалізація in vivo (MPB)

Морфологію головного мозку пацюків досліджували на P12 й P37 шляхом MPB in vivo. Спочатку пацюків анестезували схваленою системою (TEM Segal, Франція), використовуючи інгаляцію 3 % ізофлурану при струмі 0,6 л/хв повітрям з 30 % кисню. Після індукції анестезію підтримували газом ізофлураном при 1,5-2 % і струмі 0,6 л/хв. Температуру тіла контролювали й підтримували на рівні 37 ± 1 °C шляхом використання електрогрілки із циркулюючою водою. Моніторинг частоти дихання проводили протягом усього експерименту. Пацюків поміщали в похилому положенні на пластмасову підкладку (Bruker Biospec Animal Handling Systems, Німеччина), обладнану стереотаксичною фіксацією (зубна пластинка й вушні шпильки). Потім поміщали внутрішньовенний катетер калібру 22 у хвостову вену пацюків для наступних ін'єкцій.

Сканування проводили на системі Bruker 7T Biospec (Bruker, Німеччина), обладнаною установкою градієнта 400 мТ/м, використовуючи трансмісійну котушку корпусу (o.d. = 112 мм й i.d. = 72 мм), і поверхневу котушку діаметром 25 мм використають для прийому сигналу. Ехолатор швидкого градієнта із трьома ортогональними орієнтаціями і 5 см полем зору спочатку використали для ідентифікації областей головного мозку, які давали можливість обчислення фіксованих просторових координат для наступних сканувань. Проводять дві послідовності швидкого сканування з релаксаційним посиленням (RARE) в осьовій площині. Перші T2-зважені зображення знімають із послідовністю спін-ехо імпульсів, використовуючи час повторення імпульсу (TR) 4200 мс, однократний ехо-сигнал при часі появи ехо-сигналу (TE) 36 мс, діапазон прийому 35714 Гц і час сканування 4 хв. Другі T2-зважені зображення знімають із послідовністю спін-ехо імпульсів, використовуючи TR 3000 мс, два ехо-сигнали з TE 17 мс й 51 мс, діапазон прийому 55555 Гц і час сканування 5 хв. Для обох послідовностей було знято всього 30 зрізів (товщиною 800 мкм) з полем зору 2,56 см і розміром матриці зняття даних 256×256 , які приводять у результаті до дозволу в одній площині 100×100 мкм.

Для оцінки динаміки цереброменінгеального й церебровентрикулярного бар'єрів у пацюків, ін'єктованих білком ENV, використали метод MPB, посиленої гадолінієм. Фронтальні прекоонтрастні T1-зважені зображення знімали при послідовностях швидкої експозиції з малим кутом відхилення (FLASH) і часу повторення/часу луни-сигналу = $2,2/1,4$ мс. Було знято всього 30 зрізів (товщиною 800 мкм) з полем зору 2,56 см і розміром матриці зняття даних 256×192 , які приводять у результаті до дозволу в одній площині 100×133 мкм. Потім тварини одержували болюсну ін'єкцію гадолінія 0,5 M (Dotarem®, Guerbet, Франція) (1 мол/кг маси тіла). Посткоонтрастне T1 сканування проводили через 10 хв після введення гадолінію в таких же умовах, як описано вище.

6. Поведінковий аналіз

На P15 й P40 пацюків тестували на локомоторну активність, використовуючи автоматизований цифровий апарат, з'єднаний з PC комп'ютером (Imetronic, Pessac, Франція). Моніторинг локомоторної активності проводили в іспитовій клітці з фотоелементом, обладнаної пристроєм із чотирьох паралельних горизонтальних інфрачервоних датчиків виявлення по

перериванню променя (два попереду й два позаду), розташованих на 0,7 см вище підлоги, для виміру горизонтальної активності.

Число переривань променя реєстрували автоматично. Горизонтальну активність виражали в числі перетинань клітки (тобто послідовних переривань променя на будь-якій стороні клітки).

5 Число перетинань клітки безупинно реєстрували й кумулювали за 10-хвилинні інтервали.

Для всіх пацюків локомоторну активність оцінювали в умовах слабкого стресу (тобто після впливу нового навколишнього середовища або після і.р. ін'єкції фізіологічного розчину) і при стимуляції амфетаміном. Всі ці тести проводили під час неактивної фази (світловий період). Для тесту новизни пацюків витягали з їхньої домашньої клітки й поміщали в індивідуальну клітку з фотоелементом, і локомоторну активність вимірювали протягом 1 г. Потім пацюки одержували ін'єкції фізіологічного розчину (1 мол/кг, і.р.), і моніторинг їхньої локомоторної активності проводили протягом однієї додаткової години. Нарешті, тваринам ін'єктували D-амфетамін (сульфат, 1,5 мг/кг, і.р., Sigma Aldrich, A-5880, партія 90K3354), і їх активність реєстрували протягом двох додаткових годин.

15 В. Результати

1. Магнітно-резонансна візуалізація in vivo

а) Після першої бустер- ін'єкції білка ENV

На P12 кількісний аналіз T2-зважених зображень більшості тварин виявили більш гіперсигнали, які відповідають бічним шлуночкам. У порівнянні із класичними MPB зображеннями головного мозку пацюків, не підданих впливу, розширення цих гіперсигналів, спостережуване в даному дослідженні, дозволяє припустити набряк бічних шлуночків у відповідних тварин. Крім того, більш сильну експансію правого бічного шлуночка (тобто ін'єктованого) спостерігали як у фальшиво, ін'єктованих, так й в ENV- ін'єктованих тварин. Ступінь гіперсигналів, які відповідають бічним шлуночкам, спостережуваних у тварин, ін'єктованих білком ENV, відрізнялася в порівнянні із тваринами, ін'єктованими ФСБ, що дозволяє припустити, що білок ENV запускає нейрозапальні процеси.

Порівняння T1-зважених зображень, знятих до й після ін'єкції гадолінія, виявили розходження у тварин, ін'єктованих ФСБ або білком ENV. Ці результати дозволяють припустити, що цереброменінгеальний і церебровентрикулярний бар'єри можуть бути змінені через 12 діб після інтрацеребровентрикулярної (icv) ін'єкції білка ENV.

б) Після другої бустер- ін'єкції білка ENV

Як описано після бустер- ін'єкції білка ENV, кількісний аналіз T2-зважених зображень, отриманих після другої бустер- ін'єкції (P37), виявив більш гіперсигнали, які відповідають бічним шлуночкам, у більшості тварин. У фальшиво- ін'єктованих пацюків автори винаходу не виявили якого-небудь значимого гіперсигналу (з урахуванням підвищення сигналу вище нормального фоновому сигналу цереброспинальної рідини, яка звичайно візуалізується на MPB усередині шлуночків головного мозку), який відповідав бічним шлуночкам, між двома тимчасовими крапками. Дивно, що ENV- ін'єктовані пацюки проявляли сильне розширення цих гіперсигналів після другої ін'єкції. Навіть більше значимо, що гіперсигнали могли поширюватися в навколишні структури, зокрема, у гіпокамп. MP зображення, одержані в ENV- ін'єктованих пацюків, оброблених химерним антитілом Ig4, виявили сильне розширення гіперсигналів, які відповідають бічним шлуночкам.

Цікаво, що поширення цих T2-зважених гіперсигналів у навколишні структури, такі як гіпокамп, було обмеженим в ENV- ін'єктованих пацюків, оброблених химерним антитілом Ig4. Оскільки антитіло ін'єктовано на периферії центральної нервової системи - ЦНС - (внутрішньочеревно), цей останній момент підкреслює ті факти, що:

- негайні протизапальні відповіді в шлуночках головного мозку, які ставляться винятково до конкретного протоколу, використовуваному для дійсної тваринної моделі, у якій використовують пряму icv ін'єкцію білка MSRV ENV, не інгібуються негайно лігандом химерного антитіла Ig4, ін'єктованим більш ніж через 24 г після icv ін'єкції ENV й, отже, після ініціації локального запалення шлуночків. Необхідно уточнити, що локальне запалення шлуночків не є основною ознакою патогенезу при психозі, і, найбільше імовірно, не залучено в нейроповедінкові проблеми в даній моделі. Це негайне локальне запалення після icv можна, отже, розглядати як побічний ефект даної моделі.

- релевантні ознаки, відомі як асоційовані з експресією психозу, такі як патогенна втягненість гіпокампу, у цьому випадку інгібується в пацюків, ін'єктованих терапевтичним лігандом за даним винаходом у формі химерного антитіла з Ig4 людини, ін'єктованого після icv ін'єкції ENV на відстані від ЦНС і на периферії ЦНС. У цьому випадку про це свідчить інгібування поширення гіперсигналів, спостережуваних на MPB, з шлуночків на критичну ділянку гіпокампу головного мозку.

Порівняння Т1-зважених зображень, знятих до й після ін'єкції гадолінія, не виявили яких-небудь видимих розходжень у всіх групах. Ці результати дозволяють припустити, що церебромінінгеальний і церебровентрикулярні бар'єри, очевидно, додатково не змінюються після другої бустер-ін'єкції білка ENV.

У цій першій серії експериментів автори винаходу вперше показали, що дві ісв бустер-ін'єкції білка ENV можуть привести до нейрозапальних процесів в областях шлуночків і гіпокампу в пацюків, які одержали ENV-індуковане імунне примірування в ранньому дорослому стані. Дивно, що анатомічні й функціональні порушення гіпокампу узгоджуються з дослідженнями МРВ, описаними в пацієнтів із шизофренією з довгостроковим погіршенням пізнавальної здатності, пов'язаним із втратою нейронів і розширенням шлуночків (Bornstein et al., 1992). Цікаво, що ушкодження гіпокампу, індуковане повторними бустер-ін'єкціями білка ENV, було інгібовано в результаті введення людського химерного антитіла Ig4 після індукції ENV-індукованого патогенезу, який узгоджується з терапевтичним ефектом ліганду при введенні в препараті цього химерного антитіла в доклінічій моделі шизофренії.

III. Експеримент 2: Оцінка нейроповедінкових порушень після однократної двосторонньої ін'єкції білка ENV у гіпокамп або бічні шлуночки пацюків

A. Матеріали й методи

1. Тварини

Самців пацюків лінії Спраг-Дулі (6-8-тижневого віку) (n=6) купували в Charles River, Франція. Тварин містили по 3 на клітку при стандартному циклі світла й темряви з вільним доступом до їжі й води й не турбували протягом 8-добового періоду акліматизації. Всі процедури погоджені з Директивою Ради Європейських співтовариств від 24 листопада 1986 (86/609/EEC) і Директивою Національної Ради від 19 жовтня 1987 (87848, "Ministere de l'Agriculture et de la Foret", Франція). Додавали всі зусилля до мінімізації числа використовуваних тварин й їхніх страждань.

2. Двостороння ін'єкція білка ENV у гіпокамп або в бічні шлуночки

На добу операції (P0) пацюків випадковим чином визначали в фальшиво-ін'єктовану групу (n=2) з ін'єкцією фосфатно-сольового буферного розчину (ФСБ) (Lonza, Франція) і дві випробувані групи з ін'єкцією ісв (пацюка ENV-ісв, n=2) або в гіпокамп (пацюка ENV-hipp, n=2) 250 нг рекомбінантного білка ENV (ENV-T, партія 081206-1, PXT Therapeutics, Гренобль, Франція), розчиненого у ФСБ.

Кожного пацюка анестезували і.р. введенням змішаного розчину ксилазіну мг/кг (Rompun®, Alcyon, Франція) і кетаміну 80 мг/кг (Imalgene®, Alcyon, Франція).

Вовну обрізали в області, яка поширюється від проміжку між вухами до області безпосередньо перед очима. Вставляли вушні пробки, і тварину фіксували в стереотаксичному інструменті із пластинкою верхніх різців на 5 мм вище внутрішньовушної лінії. Вистрижену ділянку скальпа промокали антисептичним розчином на основі хлоргексидину (Alcyon, Франція) і робили розріз від проміжку між вухами до крапки між очима. Шкіру відводили ножицями, і нищележачу тканину, включаючи періост, видаляли, щоб оголити чисту, суху ділянку черепа (приблизно 15 × 18 мм).

Пластмасова канюля (o.d. = 0,457 мм й i.d. = 0,267 мм) (Plastic One, США) була призначена для двосторонньої імплантації в бічний шлуночок або в гіпокамп. Канюлю монтували в стереотаксичному інструменті, нульове положення наконечника встановлювали на брегмі. Просвердлювали отвір у черепі над бічним шлуночком (передне-заднє, 0,92 мм; медіально-латеральне, ±1,7 мм відносно брегми) або над гіпокампом (передне-заднє, 4,8 мм; медіально-латеральне, ±5,0 мм відносно брегми). Крапку канюлі поміщали над центральними отворами, так щоб наконечник перебував на одному рівні з поверхнею черепа. Канюлю опускали на 3,5 мм через кору головного мозку в бічний желудочек або на 7,5 мм у гіпокамп.

Для кожного пацюка ін'єкцію одного ФСБ або з білком ENV здійснювали за допомогою ін'єктора з нержавіючої сталі, поміщеного в канюлю й просунутого на 0,5 мм нижче наконечника канюлі. Ін'єктор був з'єднаний поліетиленовою трубкою зі шприцом Гамільтона (VWR, Франція) для ручної подачі розчинів за 3-хвилинний період. Ін'єктор витягали через 3 хв після завершення упорскування, щоб запобігти витоку ФСБ або білка ENV слідом за ін'єктором.

Рану закривали, використовуючи хірургічну нитку на голкотримачі. Тварині давали можливість відновитися в індивідуальній клітці протягом 2-добового періоду. Потім тварин випадковим чином поміщали по трьох на клітку й не турбували протягом подальших експериментів.

3. Поведінковий аналіз

Локомоторна відповідь пацюків досліджували в умовах слабого стресу у відкритому полі, використовуючи три парадигми: новизну, ін'єкцію фізіологічного розчину й стрес обмеження.

Локомоторна відповідь на новизну тестували на P5, P6, P7, P11 й P12, тоді як локомоторну активність після ін'єкції фізіологічного розчину й стресу обмеження тестували однократно на P11 й P13, відповідно.

Апарат відкритого поля складався із квадратного ящика (80 × 75см × 40см), виготовленого з дерева, яке було слабко освітлене. Підлога відкритого поля була розділена на дев'ять квадратних зон однакового розміру. Для тесту на новизну пацюків індивідуально поміщали в центр відкритого поля й давали можливість досліджувати поле протягом 5 хв. Потім пацюкам давали можливість повернутися в їхню домашню клітку. Поле очищали фізіологічним розчином між тваринами. Для тесту на ін'єкцію фізіологічного розчину на P11 пацюка одержували ін'єкцію фізіологічного розчину (1 мл/кг, i.p.), і їх негайно поміщали в центр відкритого поля й давали можливість досліджувати поле протягом 5 хв. Для тесту на стрес обмеження тварин обмежували за допомогою іммобілізації на 15 хв у плексигласовій трубці (5,5 см × 21см) і негайно поміщали в центр відкритого поля й давали можливість досліджувати поле протягом 5 хв.

Для всіх тестів поведінки кожної тварини спостерігав експериментатор. Загальну горизонтальну рухову активність кількісно визначали як число ліній, пересічених за 5-хвилинний період. Крім того, число вертикальних стійок (підйомів на задні лапки, коли передні лапки перебувають у повітрі або напроти стінки) оцінювали в такий спосіб: 0 = відсутні, 1 = мале, 2 = середнє, 3 = високе, 4 = дуже високе.

В. Результати

1. Локомоторна відповідь на новизну

Для всіх моментів часу після впливу новизни всі пацюки проявляли високий ступінь горизонтальної й вертикальної локомоторної активності у відкритому полі протягом 5-хвилинного періоду.

Загальні результати тесту на новизну в різні експериментальні моменти часу представлені на Фіг. 27. У всіх ENV- ін'єктованих тварин збільшення горизонтальної локомоторної активності було відсутнє в ранній період після ін'єкції (P5), але поступово з'являлося згодом, зокрема, у пацюків, ін'єктованих у гіпокамп (пацюків ENV-hipp) (фіг. 27A). Цікаво, що тільки пацюки ENV-hipp проявляли постійну загострену горизонтальну активність на P12. Крім того, підвищена вертикальна локомоторна активність була виявлена вже на P5 й P6 у пацюків ENV-hipp, тоді як ніякої відмінності від фальшиво- ін'єктованих тварини не зареєстрована в пацюків ENV-icv у ті ж моменти часу.

2. Локомоторна активність після ін'єкції фізіологічного розчину

Після впливу ін'єкції фізіологічного розчину всі пацюки проявляли високий ступінь горизонтальної й вертикальної локомоторної активності у відкритому полі протягом 5-хвилинного періоду.

Тільки пацюки ENV-hipp проявляли явне збільшення горизонтальної локомоторної активності в порівнянні з фальшиво- ін'єктованими тваринами (фіг. 28A), тоді як вертикальна локомоторна активність всіх груп була подібною (фіг. 28B).

3. Локомоторна активність після стресу обмеження

Після впливу стресу обмеження всі пацюки проявляли високий ступінь горизонтальної й вертикальної локомоторної активності у відкритому полі протягом 5-хвилинного періоду. Як для горизонтальної, так і для вертикальної активності пацюки ENV-hipp проявляли більш високу локомоторну активність у порівнянні з фальшиво-ін'єктованими тваринами, тоді як явної відмінності неможливо було виявити між фальшиво-ін'єктованими і ENV-icv пацюками (Фіг. 29).

У цій другій серії експериментів автори винаходу показали, що однократна двостороння ін'єкція білка ENV у бічні шлуночки або в гіпокамп може приводити до загострення чутливості до умов слабого стресу. Крім того, було показано, що зміни поведінки є значно більш важкими й постійними в пацюків ENV-Hipp. Крім того, аберрантна локомоторна відповідь на провокацію стресом обмеження спостерігали тільки в пацюків ENV-Hipp. Пацюка із двосторонньою ін'єкцією в гіпокамп білка ENV забезпечують релевантну модель більшою мірою, ніж icv-ін'єктована модель, з метою дослідження терапій для шизофренії в доклінічній моделі.

Таким чином, автори винаходу додатково оцінили терапевтичний ефект химерного IgG4 людини - ліганду в даній оптимізованій моделі.

IV. Оцінка химерного ліганду IgG4 не нейроповедінкові психотичні симптоми після однократної двосторонньої ін'єкції білка ENV у гіпокамп пацюків

А. Матеріали й методи

1. Тварини

Те ж, що в частині III даного прикладу.

2. Двостороння ін'єкція білка ENV у гіпокамп або в бічні шлуночки.

Те ж, що в частині III даного прикладу, з додатковою ін'єкцією антитіла якійсь тварині, як описано нижче.

Для кожного пацюка ін'єкцію кожного розчину (ФСБ, ENV й Ig4) здійснювали за допомогою ін'єктору з нержавіючої сталі, поміщеного в канюлю й просунутого на 0,5 мм нижче наконечника канюлі. Ін'єктор був з'єднаний поліетиленовою трубкою зі шприцом Гамільтона (VWR, Франція) для ручної подачі розчинів за 3-хвилинний період. Ін'єктор витягали через 3 хв після завершення упорскування, щоб запобігти витоку ФСБ або білка ENV слідом за ін'єктором. Для IgG4-оброблених пацюків ENV 2 мкг антитіла інфузували через 10 хвилин після ін'єкції білка ENV в обидві півсфери при тих же координатах. Рану закривали, використовуючи хірургічну нитку на голкотримачі. Тваринам давали можливість відновитися в індивідуальній клітці протягом 2-добового періоду. Потім тварин випадковим чином поміщали по трьох на клітку й не турбували протягом подальших експериментів.

3. Результати

Ці результати вперше забезпечили відтворення попереднього експерименту по стереотаксичній ін'єкції в гіпокамп білка ENV із загостренням чутливості до умов слабого стресу, як у прикладі, проілюстрованому нижче для P12 на Фіг. 31 А.

Дивно, що не спостерігалось в попередньому експерименті, у якому припиняли спостереження за тваринами після 12 доби (P12), було показано, які зміни поведінки (неопрацьованих) ENV+ пацюків перетерплюють значний розвиток від гіперреактивності на слабкий стрес, ще спостережуваної на P12, до гіпореактивності (загальмованості), які спостерігають у цій групі на P32 (представленої середнім стовпчиком на гістограмах фіг. 30А). Окремо від нижчеописаних результатів по терапевтичному ефекті ліганду IgG4 на добу 32 це спостереження досить цікаво, оскільки відтворює ключові ознаки природного клінічного розвитку підтипу шизофренії людини, для якого ідентифікована кореляція із присутністю підвищеної антигенемії ENV й CRP у крові (як показано в прикладі 8): поява "фази негативної симптоматики" (гіпореактивності на стрес для даної тваринної моделі), що супроводжує зниженню пізнавальної здатності й втраті нейронів, після ранньої фази, яка характеризується позитивними симптомами (гіперреактивністю на стрес для даної тваринної моделі).

Дійсно, типово цей ефект є більш пізнім, пов'язаним із втратою нейронів, про що також може свідчити розширення шлуночків головного мозку, як у спостереженнях МРВ, здійснених під час даного дослідження головного мозку пацюків, проведеного через 9 місяців після первинної ісв ін'єкції ENV. Знову ж, цікаво, що об'єктивно не визначено кількісно відповідними поведінковими тестами, як у даному експерименті, ці пацюки перетерплювали прогресуючий розвиток у напрямку примітної гіпореактивності протягом цього довгого періоду; це можна було спостерігати суб'єктивно, але постійно.

У цьому випадку, при кількісних і відповідних тестах, це зрушення від "позитивних симптомів" до "негативних симптомів" підтверджений другим тестом на стрес обмеження на P32 (Фіг. 30В) тварин, ін'єктованих білком ENV у гіпокамп, проти контролів (SHAM). Отже, це підсилює значимість і важливість терапевтичного ефекту, даним описаного в подібних тварин, оброблених лігандом IgG4, після паралельної ін'єкції білка MSRV ENV.

Як видно на Фіг. 31А, у тварин "ENV+", оброблених IgG4, не розвивалося це зниження пізнавальної здатності з появою даної поведінкової гіпореактивності (загальмованості) на P32, і їх неможливо було диференціювати від контролю SHAM у цей момент часу (як проілюстровано стовпчиками, які перекриваються, помилки на гістограмах), тоді як дане розходження було значимим для неопрацьованих тварин (відсутність перекривання стовпчиків помилок на гістограмах). Знову ж, другий поведінковий тест після стресу обмеження відтворив дане розходження між пацюками "ENV+", обробленими лігандом IgG4, і неопрацьованими тваринами навіть з більш високими відмінностями у результатах між двома групами: якщо неопрацьовані тварини "ENV+" мали активність, більш знижену майже наполовину в порівнянні з обробленими тваринами, останні мали результати, які не відрізняються від контролів SHAM (Фіг. 31В).

Таким чином, оскільки ідентифіковано, що підтип шизофренії з підвищеними сироватковими рівнями CRP асоційований з MSRV у прикладі 8 і характеризується даною останньою фазою "негативної симптоматології", яка супроводжує зниження пізнавальної здатності й втраті нейронів, дані по корисному терапевтичному ефекті в доклінічній моделі лікування лігандом IgG4 знезацька свідчили про таку різку симптоматологію; це, після того як ін'єкція MSRV ENV ініціює релевантний патогенетичний процес у даній моделі, підтверджує чистий терапевтичний ефект ліганду за даним винаходом при таких формах шизофренії (Dickerson, F., C. Stallings, et al. 2007).

Приклад 18: Аналіз in vivo химерного антитіла GNbAC1 ізотипу IgG1 на терапевтичний ефект у тваринній моделі раку, щепленого клітинами лімфоми людини

I. Експеримент 1: Ефект химерного антитіла IgG1 GNbAC1 на міграцію клітин В-лімфоми людини, ін'єктованих підшкірно безтимусним мишам

A. Матеріали й методи

1. Тварини

5 Вільних від патогенів самок безтимусних мишей (6-8-тижневого віку) ($n=4$) купували в Charles River, Франція. Тварин розміщували в одній клітці при стандартному циклі світла й темряви з вільним доступом до їжі й води й не турбували протягом 8-добового періоду акліматизації. Всі процедури погоджені з Директивою Ради Європейських співтовариств від 24 листопада 1986 (86/609/EEC) і Директивою Національної Ради від 19 жовтня 1987 (87848, 10 "Ministere de l'Agriculture et de la Foret", Франція). Додавали всі зусилля до мінімізації числа використовуваних тварин й їхніх страждань.

2. Культура клітин

15 Клітинна лінія Akata являє собою клітинну лінію, позитивну за вірусом Епштейна-Барра, виділену від пацієнта, який страждав лімфомою Беркитта. Цю клітинну лінію підтримували в середовищі RPMI 1640 (Sigma, Франція) з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки (Gibco®, Invitrogen, Франція), 40 од. пеніциліну на мл й 50 мкг стрептоміцину на мл при 37 °C у зволоженій атмосфері 5 % CO₂.

3. Ін'єкція клітин і введення антитіла

20 На першу добу P0 15×10^7 лімфобластоїдних клітин Akata (LC) внутрішньочеревно ін'єктували всім мишам SCID. Після 24-годинної затримки три контрольні миші одержували і.р. ін'єкцію фосфатно-сольового буферу (ФСБ) (Lonza, Франція), і дві миші одержували і.р. ін'єкцію химерного антитіла IgG1.

3. Ін'єкція кліток і введення антитіла

25 На першу добу P0 15×10^7 лимфобластоїдних кліток Akata (LC) внутрішньочеревно ін'єктували всім мишам SCID. Після 24-годинної затримки три контрольні миші одержували і.р. ін'єкцію фосфатно-сольового буфера (ФСБ) (Lonza, Франція), і дві миші одержували і.р. ін'єкцію 100 мкг химерного антитіла IgG1.

4. Гістологічне дослідження й рахунок клітин

30 На P7 всіх мишей умертвляли передозуванням пентобарбіталу. Після цього клітини перитонеального промивання збирали в 5 мл ФСБ. Визначення життєздатності LC було засновано на фарбуванні перитонеальної рідини трипановим синім. LC й інші лейкоцити спостерігали й рахували за допомогою мікроскопії низької чіткості. Клітини лімфоми Беркитта людини можна було легко ідентифікувати по їхній морфології, і підтвердження їхньої специфічності було одержане за допомогою імуногістохімії, проведеної з моноклональними антитілами проти вірусу Епштейна-Барра, специфічним до експресованих латентних білків, а 35 також з моноклональними антитілами, специфічними до маркерів В-кліток людини (не показано).

40 Мишей також піддавали аутопсії для оцінки присутності патоанатомічних аномалій. Зокрема, потенційну зміну селезінки оцінювали на підставі відношення маси селезінки/тіла, обчисленого в такий спосіб: $[(\text{маса селезінки/маса тіла}) \times 100]$.

B. Результати

45 Макроскопічне обстеження всіх мишей не виявило присутності пальпованої пухлини, що було погоджено з дуже короткою тривалістю дослідження, виправданою необхідністю в напрямку антитілозалежної клітинної цитотоксичності з короткою затримкою після ін'єкції кліток лімфоми, а потім антитіла або помилкової ін'єкції. Однак спленомегалію можна було легко виявити в обох контрольних мишей, тоді як в обох IgG1-оброблених мишей не проявлялася макроскопічна модифікація селезінки. Як у попередньому експерименті з підшкірною ін'єкцією тих же клітин безтимусним мишам, у неопрацьованих мишей SCID проявлялося 2-кратне збільшення відношення маси селезінки/тіла в порівнянні з IgG1-обробленими мишами SCID (Фіг. 50 32). Макроскопічне обстеження інших органів (серця, легенів, нирок, головного мозку, кишечника й шлунка) не виявило ніяких значних аномалій.

Аналіз перитонеальної рідини IgG1-оброблених мишей виявив зниження числа як живих, так і мертвих клітин лімфоми в порівнянні з контрольними мишами (Фіг. 33A). Найбільше цікаво, що 55 приблизно 50 % клітин лімфоми, зібраних з перитонеальної порожнини мишей, оброблених химерним GNbAC1 IgG1, являли собою мертві клітини через шість діб після ін'єкції антитіла. Паралельне збільшення числа інших мононуклеарних лейкоцитів (в основному, макрофагів моноцитарного походження й декількох кліток NK у мишей SCID) спостерігали в IgG1-оброблених мишей у порівнянні з контрольними мишами (Фіг. 33B).

C. Обговорення

У цьому другому експерименті автори винаходу спостерігали, що внутрішньочеревна ін'єкція клітин лімфоми Беркітта мишам SCID може індукувати спленомегалію через 7 діб, що погоджено з попереднім дослідженням авторів винаходу на безтимусних мишах, які теж проявляють її через 19 діб. Цікаво, що в IgG1-оброблених мишей не виявлено такого збільшення селезінки.

Крім того, сполучення (i) зниження числа живих клітин лімфоми, зібраних з перитонеальній порожнині, у порівнянні з неопрацьованими тваринами, (ii) значної частини мертвих злаякісних клітин й (iii) збільшення числа інших моноклеарних лейкоцитів у високому ступені показово для антитілозалежного прямого й/або клітинно-опосередованного цитотоксичного ефекту на пухлинні клітини. Цей ефект, таким чином, відбиває (i) специфічність ліганду, тобто зв'язування з пухлинними клітинами, експресуючими епітоп-мішень у білках MSRV-ENV, експонованих на пухлинних клітинах людини, про що свідчить приклад 8, і (ii) додаткові, опосередковані ізотипом IgG1, гуморальні імунні ефекти, в які залучене руйнування пухлинних клітин. Останній ефект може бути опосередкований, наприклад, активацією комплементу IgG1-активними сайтами й, наприклад, який знищує пухлинні клітини активністю макрофагів, індукованої за допомогою взаємодії FC рецептора з GNBAC1 IgG1, пов'язаним з пухлинним антигеном MSRV-ENV.

Незалежно від механізмів, залучених в ефекти цього химерного антитіла IgG1, результати авторів винаходу демонструють інгібування проліферації клітин лімфоми в доклінічній тваринній моделі з пухлинними клітинами людини, що, таким чином, свідчить про терапевтичний потенціал антитіла, яке є лігандом анти-ENV, при лікуванні таких ENV-позитивних раків.

Посилання:

Johnson G, Wu TT. Kabat Database and its applications: future directions. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 205-6.

Chothia C, Gelfand I, Kister A. Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *J Mol Biol* 1998; 278: 457-79.

Bech P, Rafaelsen OJ, Kramp P, Bolwig TG (1978) The mania rating scale: scale construction and inter-observer agreement. *Neuropharmacology* 17:430-431.

Edgar PP, Schwartz RD (1992) Functionally relevant gamma-aminobutyric acid receptors: equivalence between receptor affinity (Kd) and potency (EC50)? *Mol Pharmacol* 41:1124-1129.

Firouzi R, A. R, Michel M, E. J-M, Hauw JJ, Malcus-vocanson C, Lazarini F, Gebhurer L, Seigneurin JM, Touraine J, Sanhadji K, Marche P, Perron H (2003) Multiple Sclerosis Associated Retrovirus Particles Cause T-Lymphocyte Dependent Death with Brain Hemorrhage, in Humanized SCID Mice Model. *Journal of Neurovirology* 9:79-93.

Houenou J, Szoke A, Meary A, Loze J-Y, Mathieu M, Leboyer M, Schurhoff F (2007) Psychometric properties of the French version of the signs and symptoms of psychotic illness (SSPI) scale. *Encephale* 33:744-750.

Huang WM (1986) The 52-protein subunit of T4 DNA topoisomerase is homologous to the gyrA-protein of gyrase. *Nucleic Acids Res* 14:7379-7390.

Janke C, Martin D, Giraud-Panis MJ, Decoville M, Locker D (2003) Drosophila DSP1 and rat HMGB1 have equivalent DNA binding properties and share a similar secondary fold. *J Biochem* 133:533-539.

Kane JM (1996) Treatment-resistant schizophrenic patients. *J Clin Psychiatry* 57 Suppl 9:35-40.

Lamande SR, Bateman JF (1993) A type I collagen reporter gene construct for protein engineering studies. Functional equivalence of transfected reporter COL1A1 and endogenous gene products during biosynthesis and in vitro extracellular matrix accumulation. *Biochem J* 293 (Pt 2):387-394.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121-127.

Minuth T, Kramer B, Lehle K, Jaenicke R, Kohnert U (1998) The spectroscopic analysis, inhibition and binding studies demonstrate the equivalence of Erythrina caffra trypsin inhibitor and the recombinant substitution variant recSerETI. *J Biotechnol* 62:231-239.

Montgomery SA, Asberg M (1979) A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry* 134:382-389.

Perron H, Firouzi R, Tuke P, Garson JA, Michel M, Beseme F, Bedin F, Mallet F, Marcel E, Seigneurin JM, Mandrand B (1997a) Cell cultures and associated retroviruses in multiple sclerosis. Collaborative Research Group on MS. *Acta Neurol Scand Suppl* 169:22-31.

Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Mallet F, Tuke PW, Voisset C, Blond JL, Lalande B, Seigneurin JM, Mandrand B (1997b) Molecular

identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7583-7588.

Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, Jolivet-Reynaud C, Marcel F, Souillet Y, Borel E, Gebuhrer L, Santoro L, Marcel S, Seigneurin JM, Marche PN, Lafon M (2001) 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.

Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche PN (2006) The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol* 176:7636-7644.

Sardana VV, Emini EA, Gotlib L, Graham DJ, Lineberger DW, Long WJ, Schlabach AJ, Wolfgang JA, Condra JH (1992) Functional analysis of HIV-1 reverse transcriptase amino acids involved in resistance to multiple nonnucleoside inhibitors. *J Biol Chem* 267:17526-17530.

Stefas E, Rucheton M, Graafland H, Moynier M, Sompeyrac C, Bahraoui EM, Veas F (1997) Human plasmatic apolipoprotein H binds human immunodeficiency virus type 1 and type 2 proteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13:97-104.

Stefas I, Rucheton M, D'Angeac AD, Morel-Baccard C, Seigneurin JM, Zarski JP, Martin M, Cerutti M, Bossy JP, Misse D, Graafland H, Veas F (2001) Hepatitis B virus Dane particles bind to human plasma apolipoprotein H. *Hepatology* 33:207-217.

Ullmann GM, Hauswald M, Jensen A, Knapp EW (2000) Structural alignment of ferredoxin and flavodoxin based on electrostatic potentials: implications for their interactions with photosystem I and ferredoxin-NADP reductase. *Proteins* 38:301-309.

Ullmann GM, Hauswald M, Jensen A, Kostic NM, Knapp EW (1997) Comparison of the physiologically equivalent proteins cytochrome c6 and plastocyanin on the basis of their electrostatic potentials. Tryptophan 63 in cytochrome c6 may be isofunctional with tyrosine 83 in plastocyanin. *Biochemistry* 36:16187-16196.

Verdolina A, Ruvo M, Cassani G, Fassina G (1995) Topological mimicry of cross-reacting enantiomeric peptide antigens. *J Biol Chem* 270:30422-30427.

Wehrmann A, Van Vliet A, Opsomer C, Botterman J, Schulz A (1996) The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat Biotechnol* 14:1274-1278.

Xu GL, Kapfer W, Walter J, Trautner TA (1992) BsuBI-an isospecific restriction and modification system of PstI: characterization of the BsuBI genes and enzymes. *Nucleic Acids Res* 20:6517-6523.

Yu H, Schurr MJ, Deretic V (1995) Functional equivalence of Escherichia coli sigma E and Pseudomonas aeruginosa Alg: E. coli rpo restores mucoidy and reduces sensitivity to reactive oxygen intermediates in algLI mutants of P. aeruginosa. *J Bacteriol* 177:3259-3268.

Zabin HB, Horvath MP, Terwilliger TC (1991) Approaches to predicting effects of single amino acid substitutions on the function of a protein. *Biochemistry* 30:6230-6240.

Antony JM, Ellestad KK, Hammond R, Imaizumi K, Mallet F, Warren KG, Power C (2007). The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes. *J Immunol* 179: 1210-24.

Antony JM, van Marie G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, Wallace JL, Deacon RM, Warren K, Power C (2004). Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci* 7: 1088-95.

Blond JL, Beseme F, Duret L, Bouton O, Bedin F, Perron H, Mandrand B, Mallet F (1999). Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol* 73: 1175-85.

Cheyne V, Oriol G, Mallet F (2006). Identification of the hASCT2-binding domain of the Env ERVWE1/syncytin-1 fusogenic glycoprotein. *Retrovirology* 3:41.

Christensen T, Dissing Sorensen P, Riemann H, Hansen HJ, Moller-Larsen A (1998). Expression of sequence variants of endogenous retrovirus RGH in particle form in multiple sclerosis. *Lancet* 352: 1033.

Deb-Rinker P, Klempan TA, O'Reilly RL, Torrey EF, Singh SM (1999). Molecular characterization of a MSRV-like sequence identified by RDA from monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia. *Genomics* 61: 133-44.

Dolei A, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Sechi G, Cirotto MC, Rosati G, Sotgiu S (2002). Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurology* 58: 471-3.

Firouzi R, Rolland A, Michel M, Jouvin-Marche E, Hauw JJ, Malcus-Vocanson C, Lazarini F, Gebuhrer L, Seigneurin JM, Touraine JL, Sanhadji K, Marche PN, Perron H (2003). Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. *J Neurovirol* 9: 79-93.

Flockerzi A, Ruggieri A, Frank O, Sauter M, Maldener E, Kopper B, Wullich B, Seifarth W, Muller-Lantzsch N, Leib-Mosch C, Meese E, Mayer J (2008). Expression patterns of transcribed human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) loci in human tissues and the need for a HERV Transcriptome Project. *BMC Genomics* 9: 354.

Garson JA, Tuke PW, Giraud P, Paranhos-Baccala G, Perron H (1998). Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet* 351: 33.

Karlsson H, Bachmann S, Schroder J, McArthur J, Torrey EF, Yolken RH (2001). Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4634-9.

Karlsson H, Schroder J, Bachmann S, Bottmer C, Yolken RH (2004). HERV-W-related RNA detected in plasma from individuals with recent-onset schizophrenia or schizoaffective disorder. *Mol Psychiatry* 9: 12-3.

Kim HS (2001). Sequence and phylogeny of HERV-W pol fragments. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: 1665-71.

Knerr I, Huppertz B, Weigel C, Dotsch J, Wich C, Schild RL, Beckmann MW, Rascher W (2004). Endogenous retroviral syncytin: compilation of experimental research on syncytin and its possible role in normal and disturbed human placentogenesis. *Mol Hum Reprod* 10: 581-8.

Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Bedin F, Ounanian-Paraz A, Sodoyer M, Ott C, Rajoharison A, Garcia E, Mallet F, Mandrand B, Perron H (1999). Molecular cloning and characterization of MSRV-related sequences associated with retrovirus-like particles. *Virology* 260: 1-9.

Langbein M, Strick R, Strissel PL, Vogt N, Parsch H, Beckmann MW, Schild RL (2008). Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. *Mol Reprod Dev* 75: 175-83.

Laufer G, Mayer J, Mueller BF, Mueller-Lantzsch N, Ruprecht K (2009). Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus env sequences. *Retrovirology* 6:37.

Lavillette D, Marin M, Ruggieri A, Mallet F, Cosset FL, Kabat D (2002). The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *J Virol* 76: 6442-52.

Linial ML, Miller AD (1990). Retroviral RNA packaging: sequence requirements and implications. In: *Retroviruses-strategies of replication*. Swanstrom R, Vogt PK, (eds). Springer-Verlag: Berlin, pp 125-152.

Malassine A, Handschuh K, Tsatsaris V, Gerbaud P, Cheynet V, Oriol G, Mallet F, Evain-Brion D (2005). Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta. *Placenta* 26: 556-62.

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

Mameli G, Astone V, Arm G, Marconi S, Lovato L, Serra C, Sotgiu S, Bonetti B, Dolei A (2007). Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. *J Gen Virol* 88: 264-74.

Noorali S, Rotar IC, Lewis C, Pestaner JP, Pace DG, Sison A, Bagasra O (2009). Role of HERV-W Syncytin-1 in Placentation and Maintenance of Human Pregnancy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*.

Perron H, Bernard C, Bertrand JB, Lang AB, Popa I, Sanhadji K, Portoukalian J (2009). Endogenous retroviral genes, Herpesviruses and gender in Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci*.

Perron H, Firouzi R, Tuke P, Garson JA, Michel M, Beseme F, Bedin F, Mallet F, Marcel E, Seigneurin JM, Mandrand B (1997a). Cell cultures and associated retroviruses in multiple sclerosis. Collaborative Research Group on MS. *Acta Neurol Scand Suppl* 169: 22-31.

Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Mallet F, Tuke PW, Voisset C, Blond JL, Lalande B, Seigneurin JM, Mandrand B (1997b). Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7583-8.

Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, Jolivet-Reynaud C, Marcel F, Souillet Y, Borel E, Gebuhrer L, Santoro L, Marcel S, Seigneurin JM, Marche PN, Lafon M (2001). Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology* 287: 321-32.

Perron H, Lalande B, Gratacap B, Laurent A, Genoulaz O, Geny C, Mallaret M, Schuller E, Stoeber P, Seigneurin JM (1991). Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet* 337: 862-3.

5 Perron H, Lazarini F, Ruprecht K, Pechoux-Longin C, Seilhean D, Sazdovitch V, Creange A, Battail-Poirot N, Sibai G, Santoro L, Jolivet M, Darlix JL, Rieckmann P, Arzberger T, Hauw JJ, Lassmann H (2005). Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *J Neurovirol* 11: 23-33.

10 Perron H, Mekaoui L, Bernard C, Veas F, Stefas I, Leboyer M (2008). Endogenous retrovirus type W GAG and envelope protein antigenemia in serum of schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 64: 1019-23.

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

15 Rasmussen HB, Perron H, Clausen J (1993). Do endogenous retroviruses have etiological implications in inflammatory and degenerative nervous system diseases? *Acta Neurol Scand* 88: 190-8.

20 Rolland A, Jouvin-Marche E, Saresella M, Ferrante P, Cavaretta R, Creange A, Marche P, Perron H (2005). Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSRV (multiple sclerosis associated retroviral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 160: 195-203.

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

25 Saresella M, Rolland A, Marventano I, Cavarretta R, Caputo D, Marche P, Perron H, Clerici M (2009). Multiple sclerosis-associated retroviral agent (MSRV)-stimulated cytokine production in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 15: 443-7.

Serra C, Sotgiu S, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Dolei A (2001). Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. *Neurol Sci* 22: 171-3.

30 Sotgiu S, Arm G, Mameli G, Serra C, Pugliatti M, Rosati G, Dolei A (2006). Multiple sclerosis-associated retrovirus in early multiple sclerosis: a six-year follow-up of a Sardinian cohort. *Mult Scler* 12: 698-703.

Sotgiu S, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Arm G, Dolei A (2002). Multiple sclerosis-associated retrovirus and MS prognosis: an observational study. *Neurology* 59: 1071-3.

35 Voisset C, Blancher A, Perron H, Mandrand B, Mallet F, Paranhos-Baccala G (1999). Phylogeny of a novel family of human endogenous retrovirus sequences, HERV-W, in humans and other primates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15: 1529-33.

40 Voisset C, Bouton O, Bedin F, Duret L, Mandrand B, Mallet F, Paranhos-Baccala G (2000). Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 731-40.

Weis S, Llenos IC, Dulay JR, Verma N, Sabuncuyan S, Yolken RH (2007). Changes in region- and cell type-specific expression patterns of neutral amino acid transporter 1 (ASCT-1) in the anterior cingulate cortex and hippocampus in schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *J Neural Transm* 114: 261-71.

45 Yolken RH, Karlsson H, Yee F, Johnston-Wilson NL, Torrey EF (2000). Endogenous retroviruses and schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31: 193-9.

Bornstein, R. A., S. B. Schwarzkopf, et al. (1992). "Third-ventricle enlargement and neuropsychological deficit in schizophrenia." *Biol Psychiatry* 31(9): 954-61.

50 Dickerson, F., C. Stallings, et al. (2007). "C-reactive protein is associated with the severity of cognitive impairment but not of psychiatric symptoms in individuals with schizophrenia." *Schizophr Res* 93(1-3): 261-5.

Aalberse and Schuurman 2002, Ig4 breaking the rules, *Immunology*. 2002, 105:9-19.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

55

1. Ліганд, який містить кожну з ділянок, які визначають комплементарність (CDR), викладених у SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 й SEQ ID NO: 6, або ліганд визначає антиліганд, представлений послідовностями SEQ ID NO: 32 або SEQ ID NO: 20.

60

2. Ліганд, який містить;

- варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), що має амінокислотну послідовність, викладену в SEQ ID NO: 7, і
- варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), що має амінокислотну послідовність, викладену в SEQ ID NO: 8,
- 5 де ліганд визначає антиліганд, представлений послідовностями SEQ ID NO: 32 або SEQ ID NO: 20.
- 3. ScFV-фрагмент, який містить ліганд згідно з будь-яким із пп. 1, 2.
- 4. Fab-фрагмент, який містить ліганд згідно з будь-яким із пп. 1, 2.
- 5. Антитіло, яке містить ліганд згідно з будь-яким із пп. 1, 2.
- 10 6. Антитіло згідно з п. 5, яке **відрізняється** тим, що є химерним, сконструйованим або гуманізованим антитілом.
- 7. Антитіло згідно з п. 5 або 6, яке є IgG.
- 8. Антитіло згідно з п. 7, яке є IgG1 або IgG4 людини.
- 9. Фармацевтична композиція, яка містить як активний інгредієнт ліганд згідно з будь-яким із пп. 1-2, scFV-фрагмент згідно з п. 3, Fab-фрагмент згідно з п. 4 або антитіло згідно з будь-яким із пп. 5-8.
- 15 10. Ліганд, який містить кожну з ділянок, які визначають комплементарність (CDR), що кодується - SEQ ID NO: 13b, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, або
- 20 - SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, де ліганд визначає антиліганд, представлений послідовностями SEQ ID NO: 32 або SEQ ID NO: 20.
- 11. Ліганд, який містить:
 - варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), що кодується SEQ ID NO: 10 або 12, і
 - 25 - варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), що кодується SEQ ID NO: 9 або 11,
 де ліганд визначає антиліганд, представлений послідовностями SEQ ID NO: 32 або SEQ ID NO: 20.
- 12. Спосіб лікування, який включає введення ліганду згідно з будь-яким із пп. 1, 2, scFV-фрагмента згідно з п. 3, Fab-фрагмента згідно з п. 4 або антитіла згідно з будь-яким із пп. 5-8,
- 30 або фармацевтично прийнятної форми ліганду згідно з будь-яким із пп. 1, 2, scFV-фрагмента згідно з п. 3, Fab-фрагмента згідно з п. 4 або антитіла згідно з будь-яким із пп. 5-8, або фармацевтичної композиції згідно з п. 9.
- 13. Спосіб лікування згідно з п. 12, для лікування захворювання, пов'язаного з MSRV (ретровірус, пов'язаний з розсіяним склерозом), вибраного з групи, яка включає розсіяний склероз, шизофренію, клінічно ізольований синдром, хронічну запальну демієлінізуючу поліневропатію, епілепсію, псоріаз, рак, запальний панкреатит і діабет, зокрема діабет типу I.
- 35 14. Спосіб лікування захворювань, пов'язаних з MSRV, згідно з будь-яким з пп. 12 або 13, який включає введення антитіла IgG4 або IgG1 згідно з п. 8 як хронічного лікування регулярно повторюваними ін'єкціями.
- 40 15. Спосіб визначення антиліганду в біологічному зразку із застосуванням ліганду згідно з будь-яким з пп. 1, 2, ScFV-фрагмента згідно з п. 3, Fab-фрагмента згідно з п. 4 або антитіла згідно з будь-яким з пп. 5-8, який включає стадії:
 - (а) приведення в контакт зразка з лігандом згідно з будь-яким з пп. 1, 2, ScFV-фрагментом згідно з п. 3, Fab-фрагментом згідно з п. 4 або антитілом згідно з будь-яким з пп. 5-8,
 - 45 (б) визначення присутності антиліганду в зразку.
- 16. Спосіб визначення антиліганду згідно з п. 14, який додатково включає стадію:
 - (в) приведення в контакт зразка з лігандом, який специфічно зв'язується з GAG-антигеном.
- 17. Набір для імунологічного аналізу для визначення антиліганду в біологічному зразку, який містить ліганд згідно з будь-яким з пп. 1, 2, ScFv фрагмент згідно з п. 3, Fab-фрагмент згідно з п. 4 або антитіло згідно з будь-яким з пп. 5-8 і реагенти для визначення специфічного зв'язування
- 50 антиліганду з вищевказаним лігандом, scFv, Fab-фрагментом або антитілом.
- 18. Набір для імунологічного аналізу для визначення антиліганду, згідно з п. 15, у біологічному зразку, який додатково включає ліганд, який специфічно зв'язується з GAG-антигеном.
- 19. Застосування набору для імунологічного аналізу, згідно з п. 15 або 16, при визначенні
- 55 захворювання, пов'язаного з MSRV, вибраного із групи, яка включає розсіяний склероз, шизофренію, клінічно ізольований синдром, хронічну запальну демієлінізуючу поліневропатію, епілепсію, псоріаз, рак, запальний панкреатит та діабет, зокрема діабет типу I.

(A)

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTISCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPKAWIYRT
SNLASGVPGRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYQSLPLTFGSG
 TKLEIK

(B)

QVQLQQSGAELVRPGAPVTLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGA
VAPETGGTAYNQKFKGKATLTAAKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTSTV
VPFAYWGQGTLLVTVSA

Fig. 1

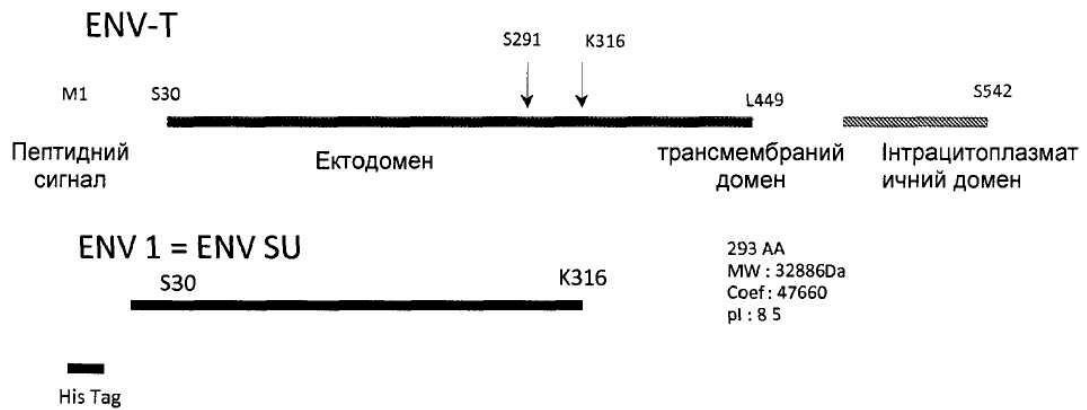
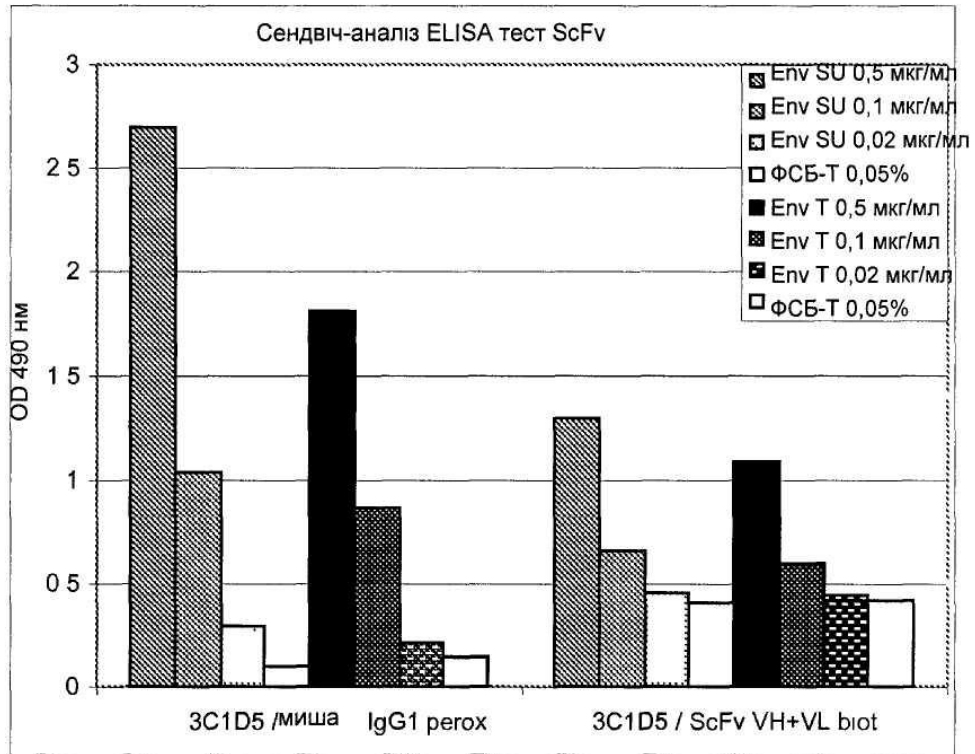
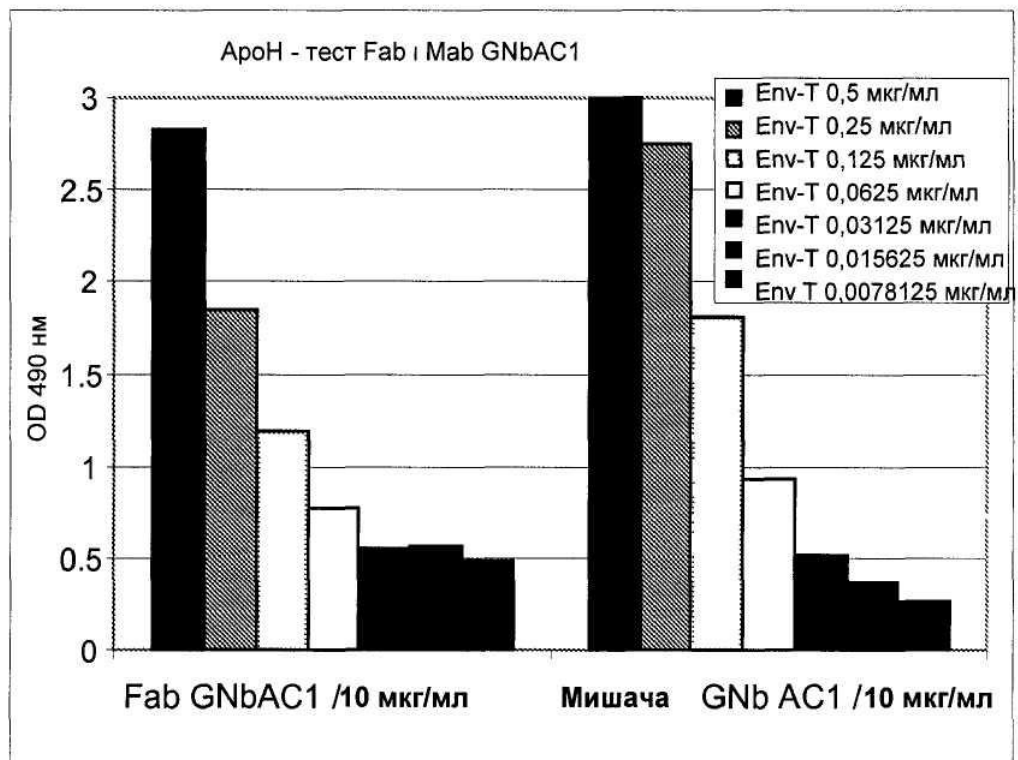


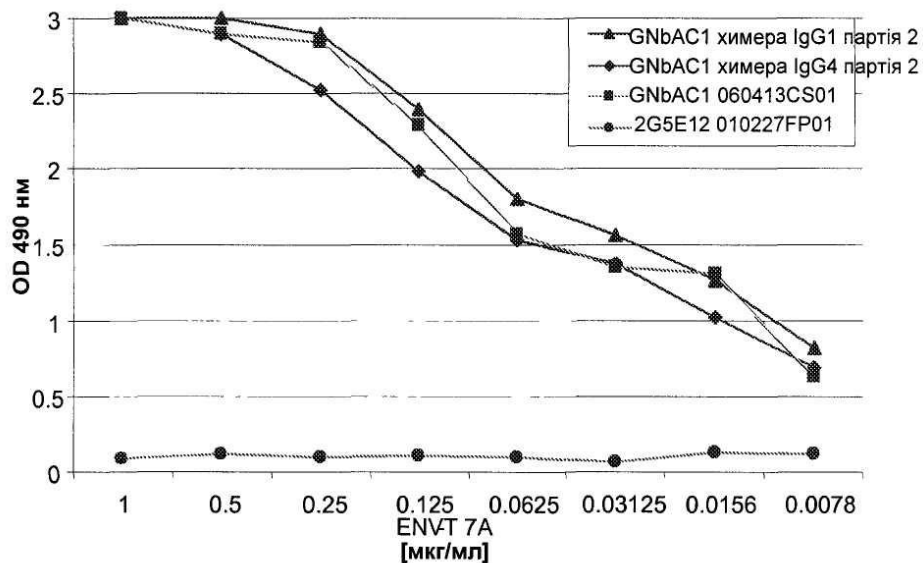
Fig. 2



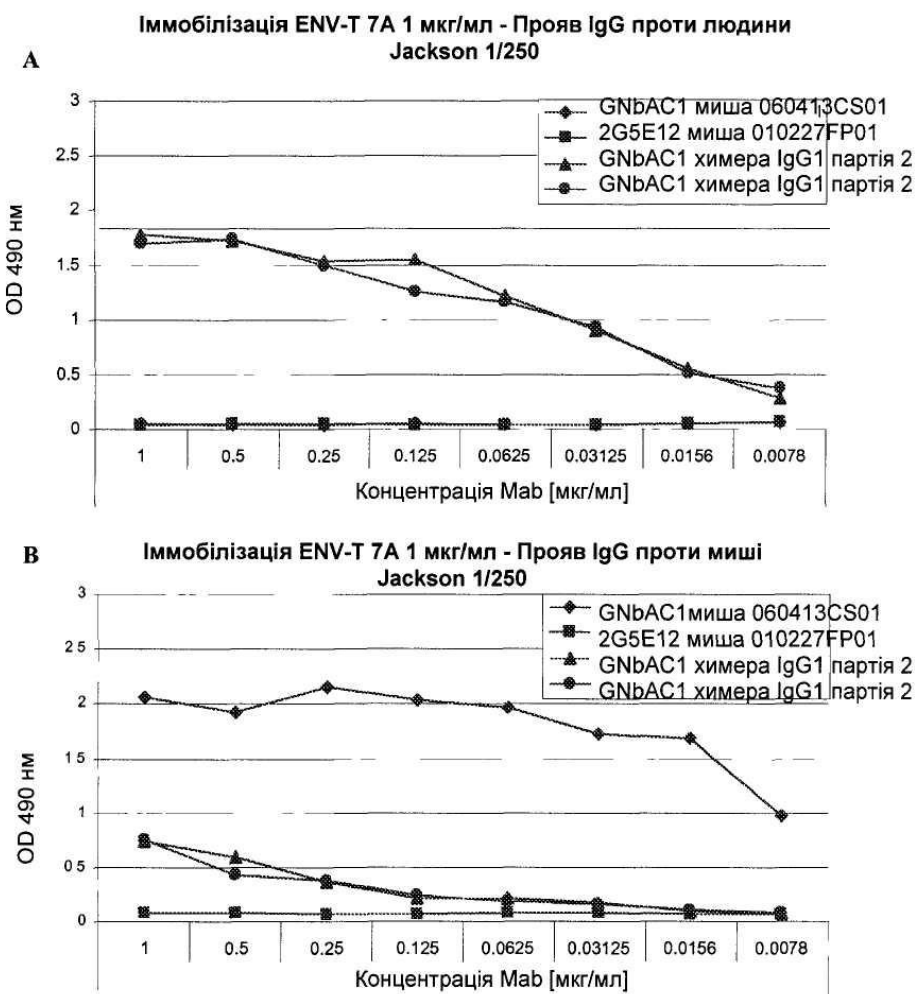
Фіг. 3



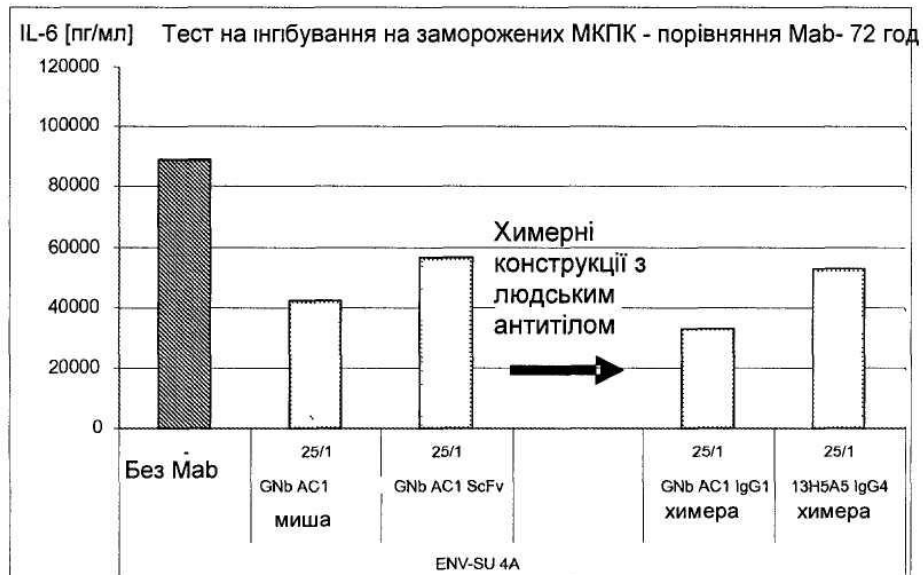
Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

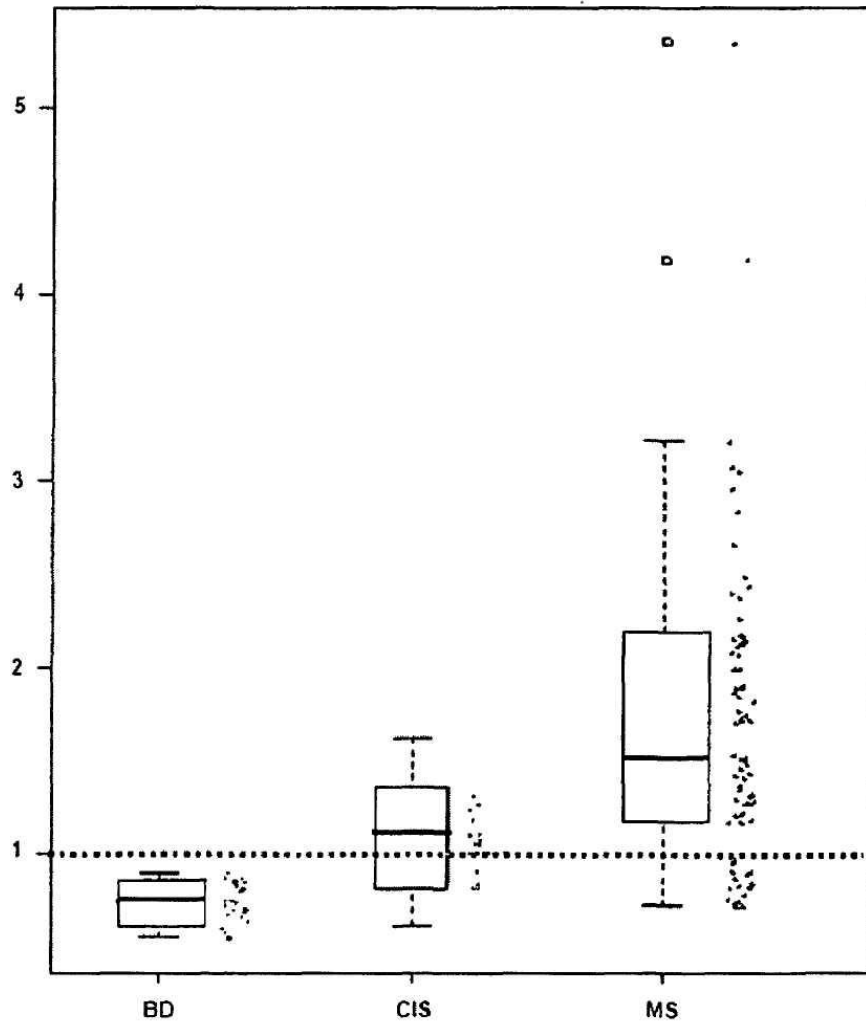
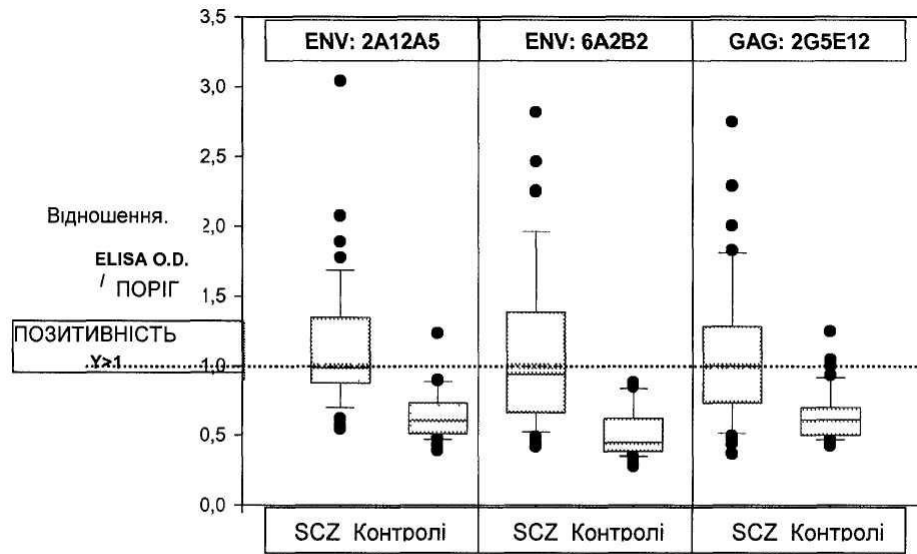
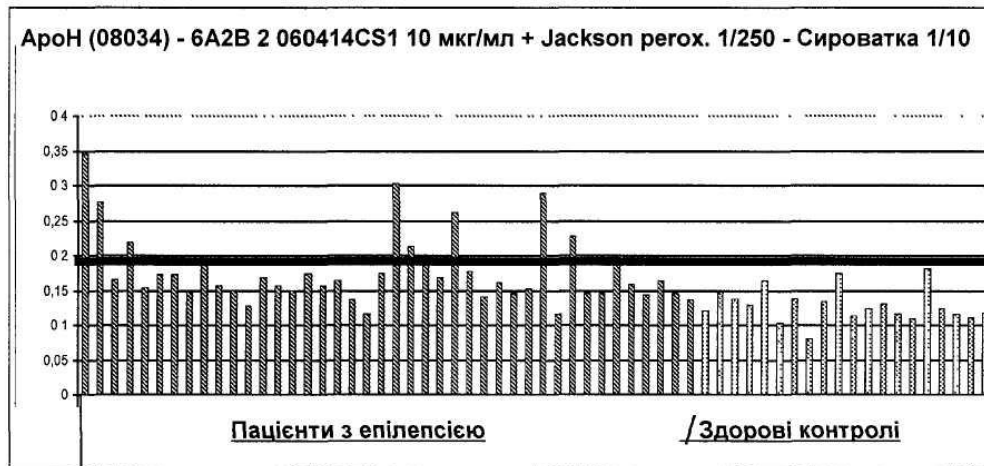


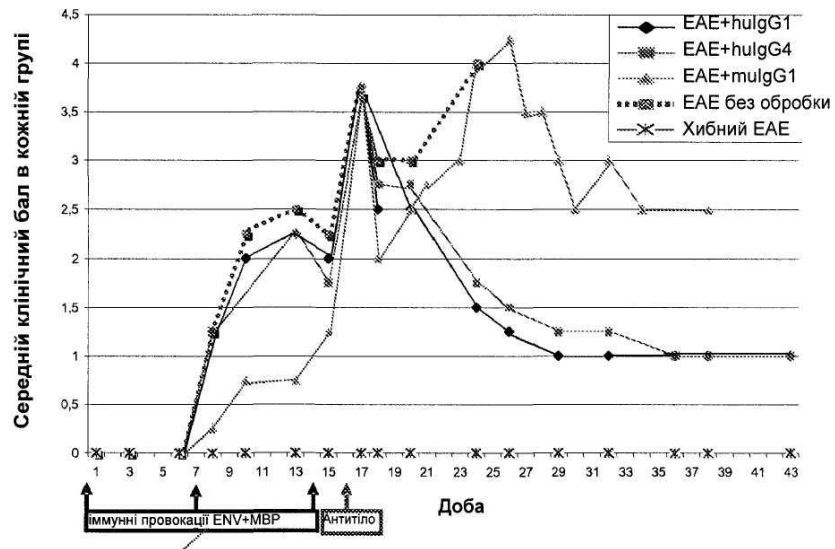
Fig. 8



Фіг. 9

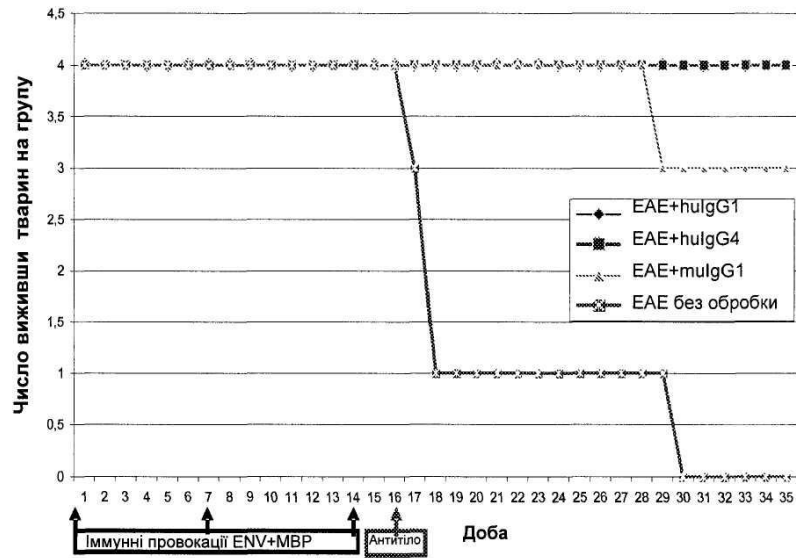


Фіг. 10

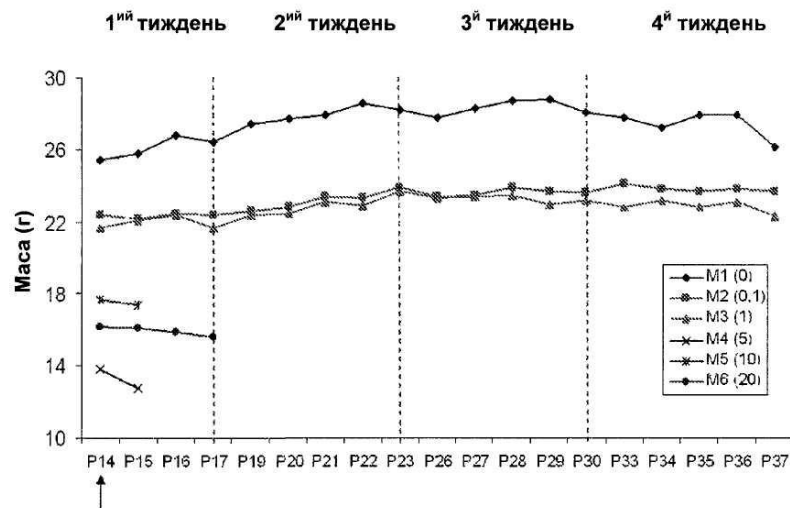


Фіг. 11

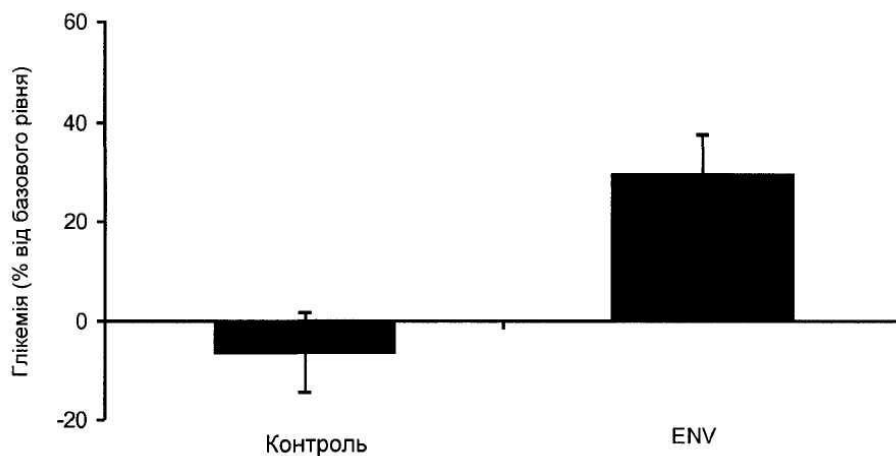
HuSCID ENV MBP EAE: Криві виживання



Фіг. 12



Фіг. 13



Фіг. 14

15A: Визначення за Кебету і Чозіа:

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTPT DYEMH WVKQTPVHGLEWIG
AVAPETGGTAYWQKFKGKATLTAAKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTS TWPFAY
 WGQGLTVTSA

15B: Переважне (комбіноване) визначення:

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCAS GYTPDYEMH WVKQTPVHGLEWIG
AVAPETGGTAYWQKFKGKATLTAAKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTS TWPFAY
 WGQGLTVTSA

Фіг. 15

QIVLTQSPMMSASPGEKVTISCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPKAWIYRTSNL
 ASGVPGRFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCQYQSLPLT
 FGSGTKLEIKR

Fig. 16

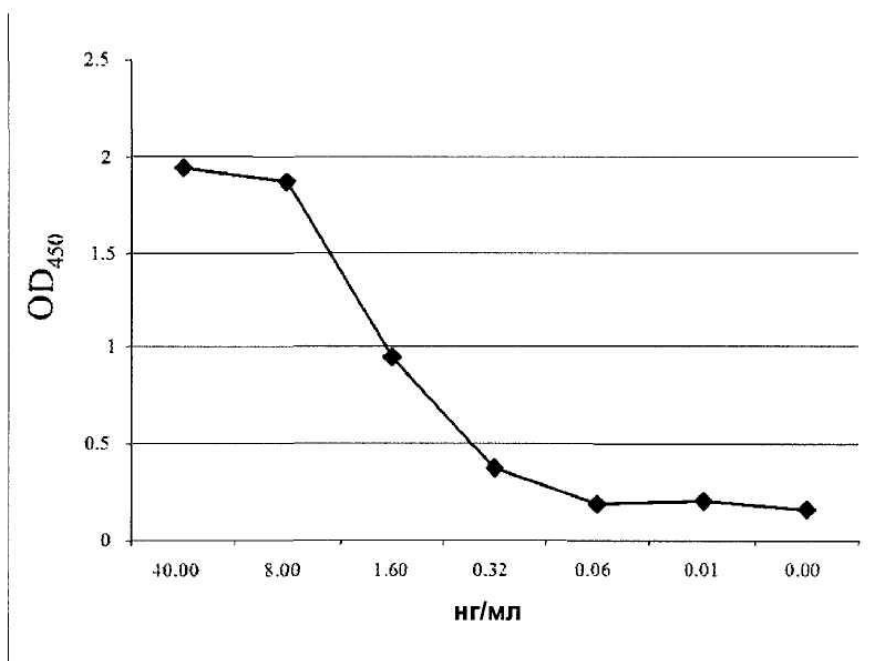
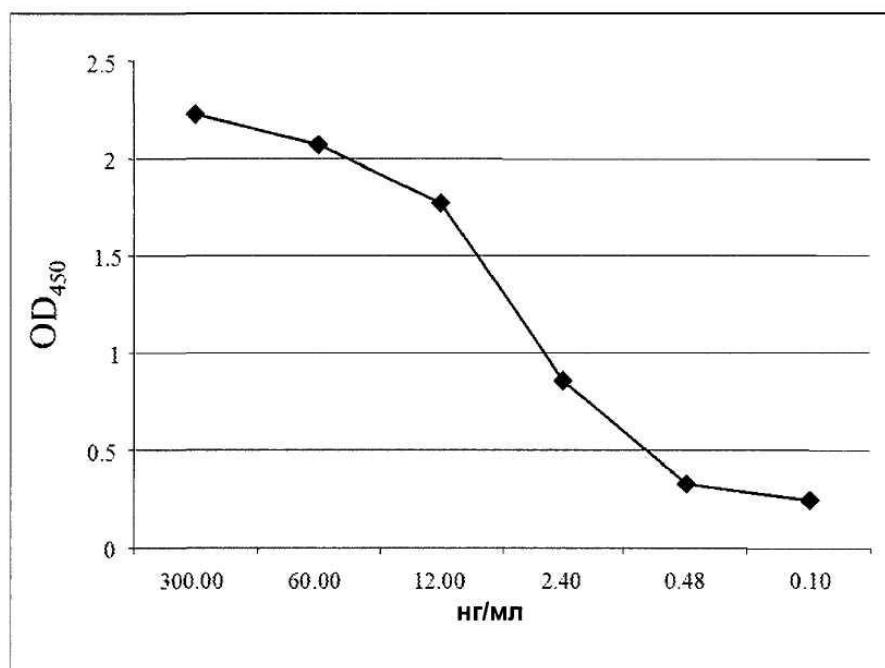
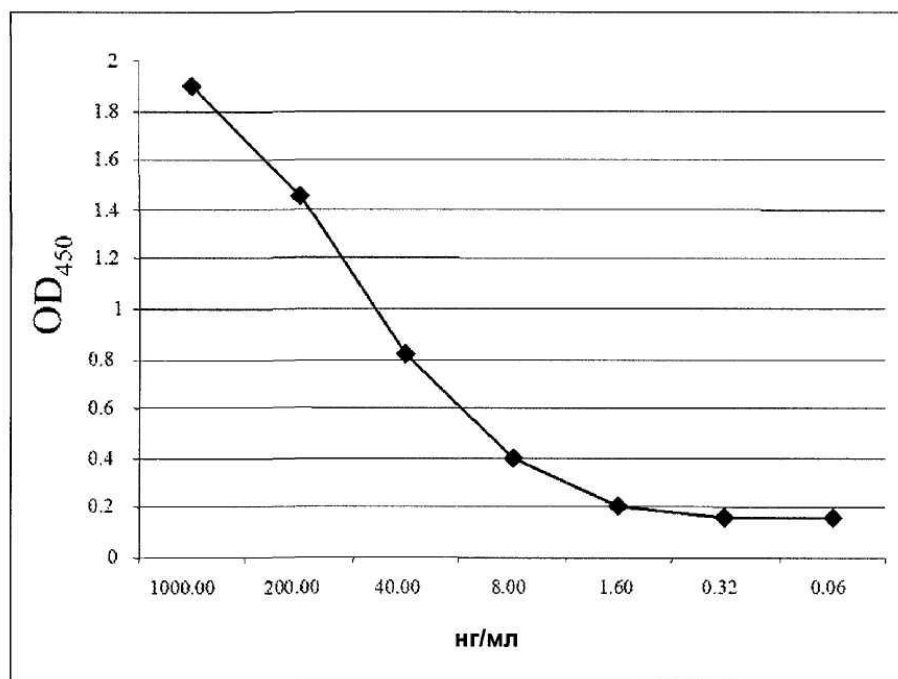


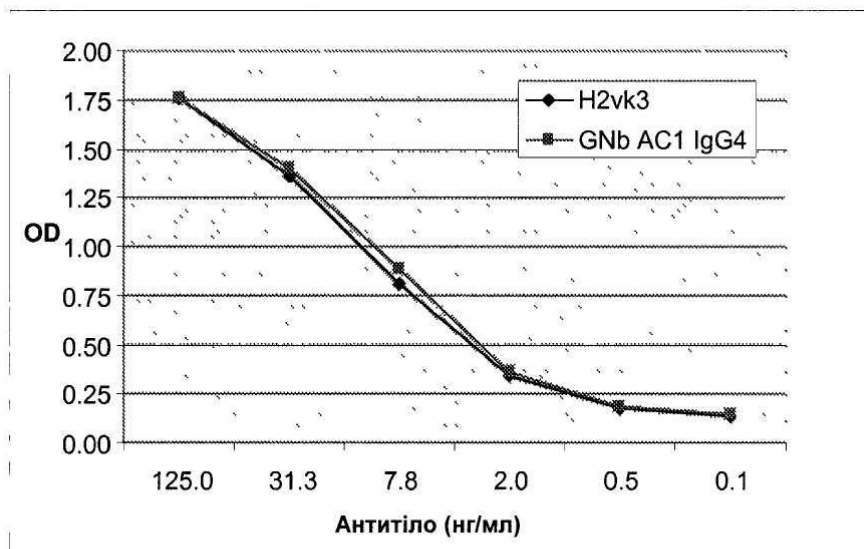
Fig. 17



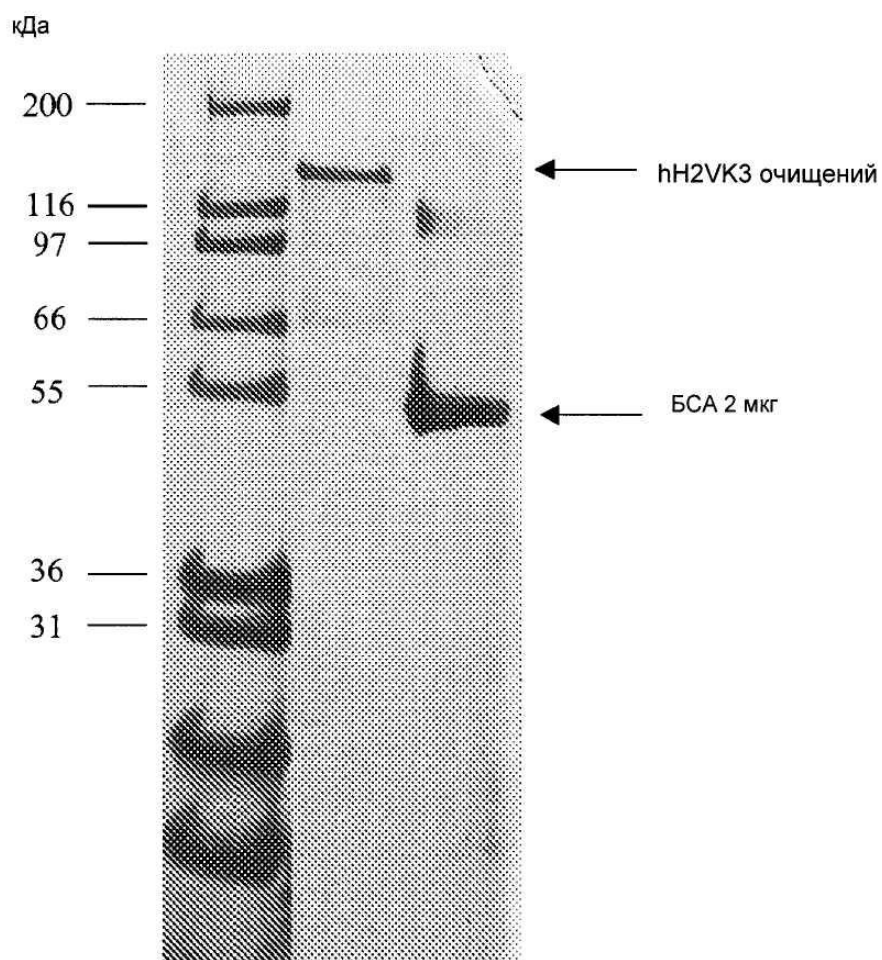
Фиг. 18



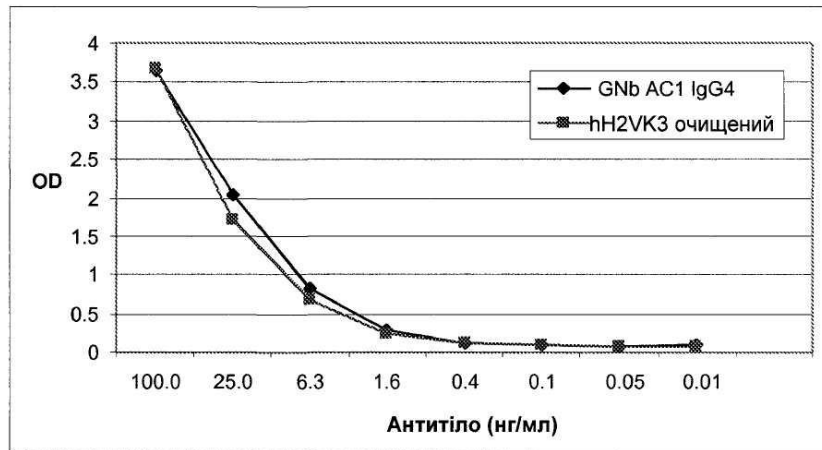
Фиг. 19



Фіг. 20



Фіг. 21



Фіг. 22

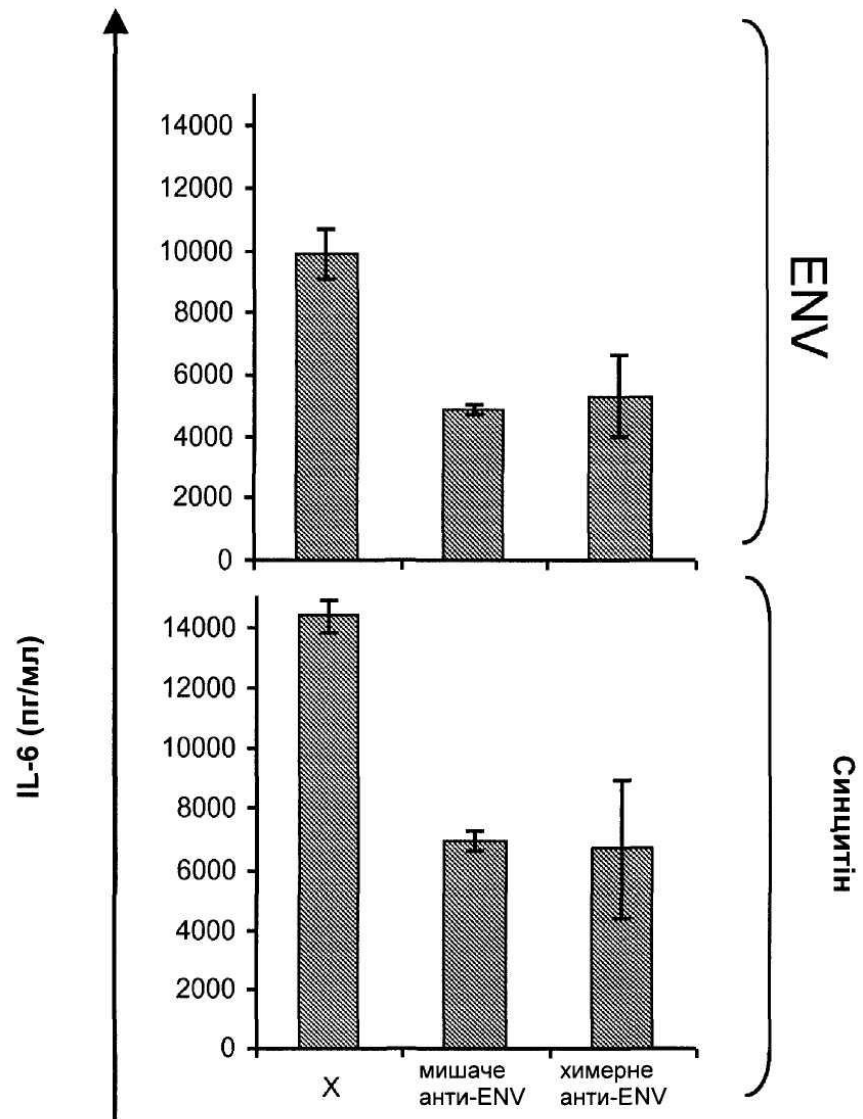
H2 Важкий ланцюг:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTETD**YEMHWVRQAPGQGLEW**¹GAVAPE
TGGTAYNQKFKGR^ATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC^{TS}TVVPFAYWGQGT
 LTVSS

VK3 Легкий ланцюг:

⁹IQ^LTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMYWQQKPGKAPK^{AW}IYRTSNLASGV
 PSRFSGSGSGTD^YLTISLQPEDFATYYCQYQSLPLTFGGGTKVEIK

Фіг. 23



Фіг. 24

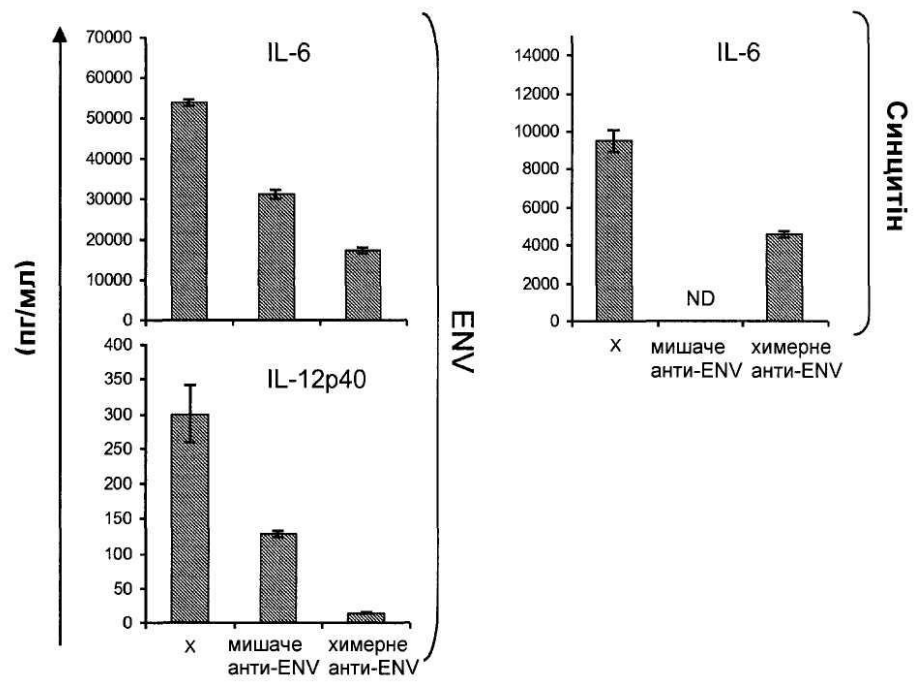
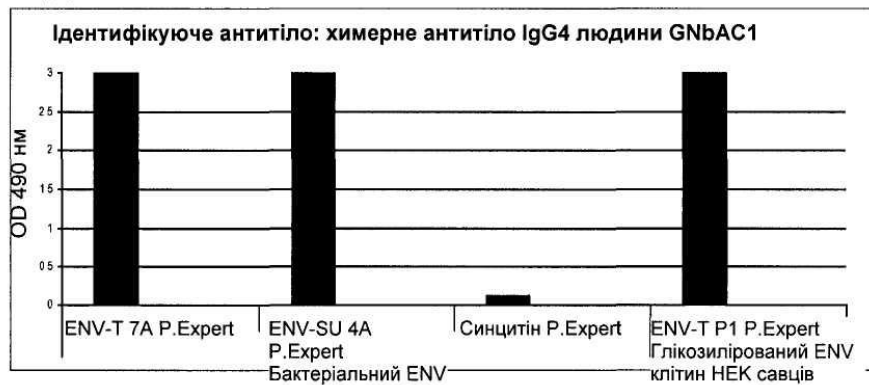


Fig. 25

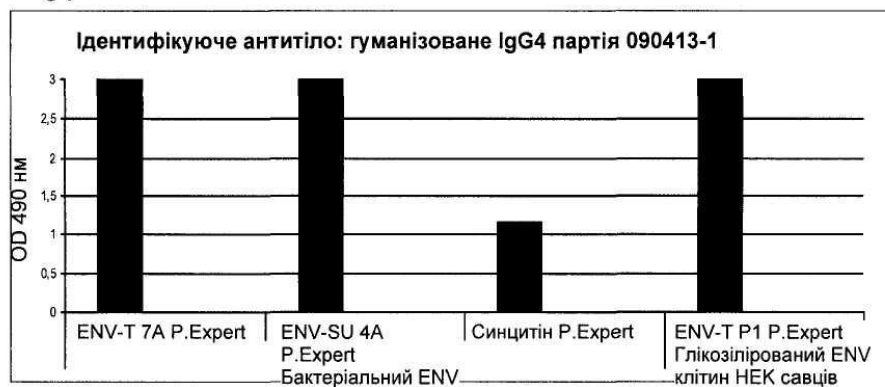
A :



B :



C :



Фіг. 26

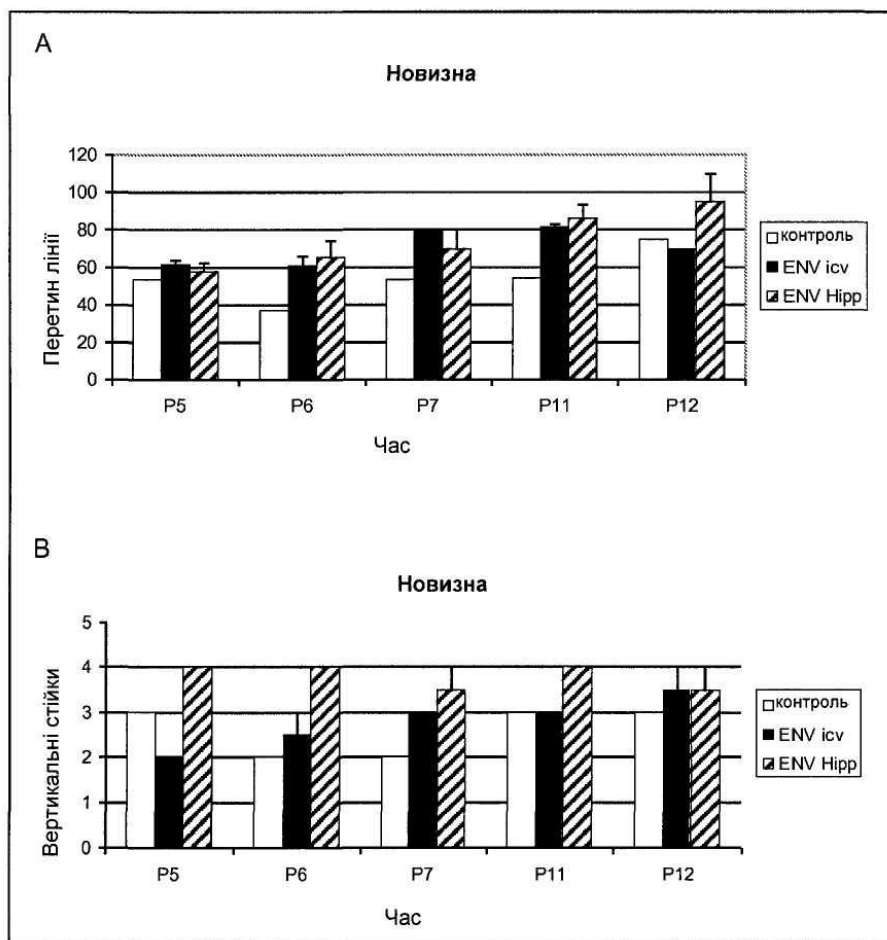


Fig. 27

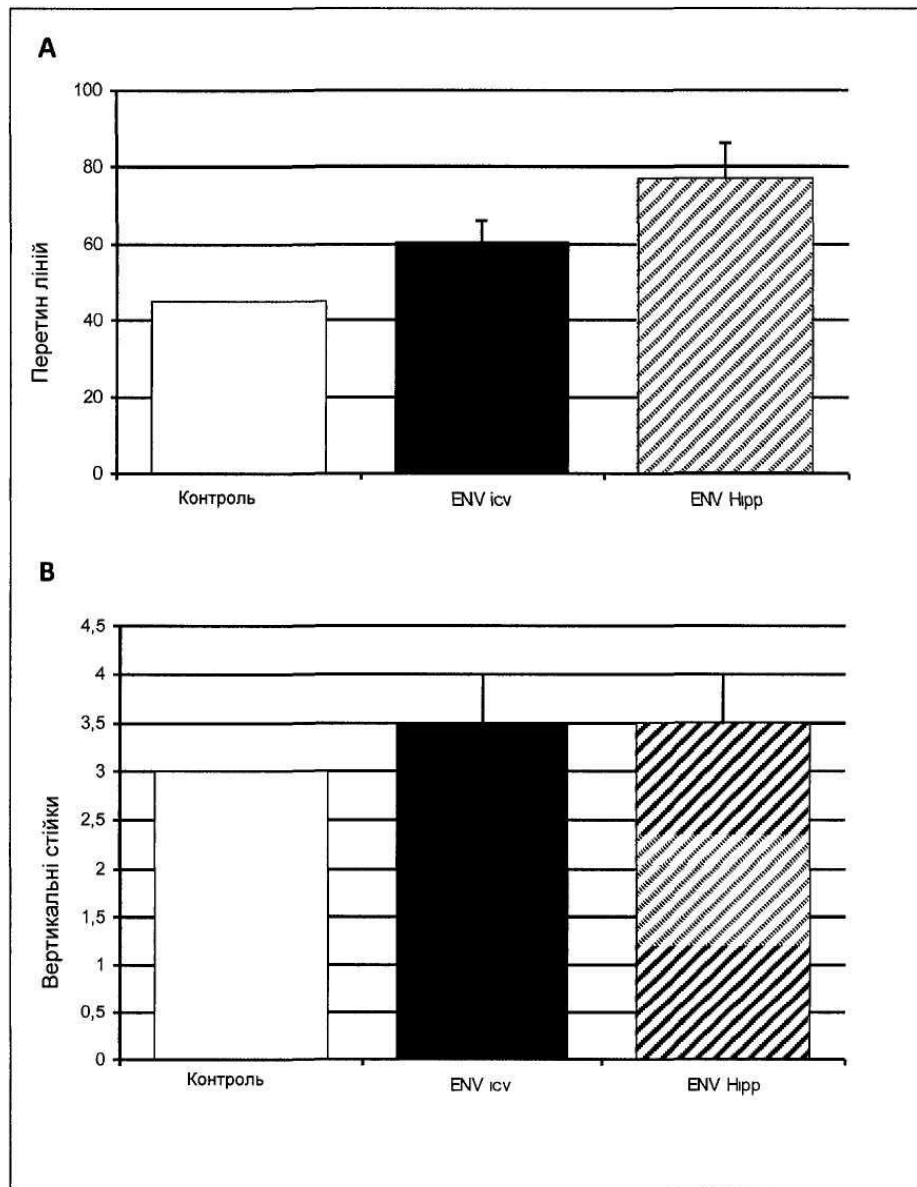
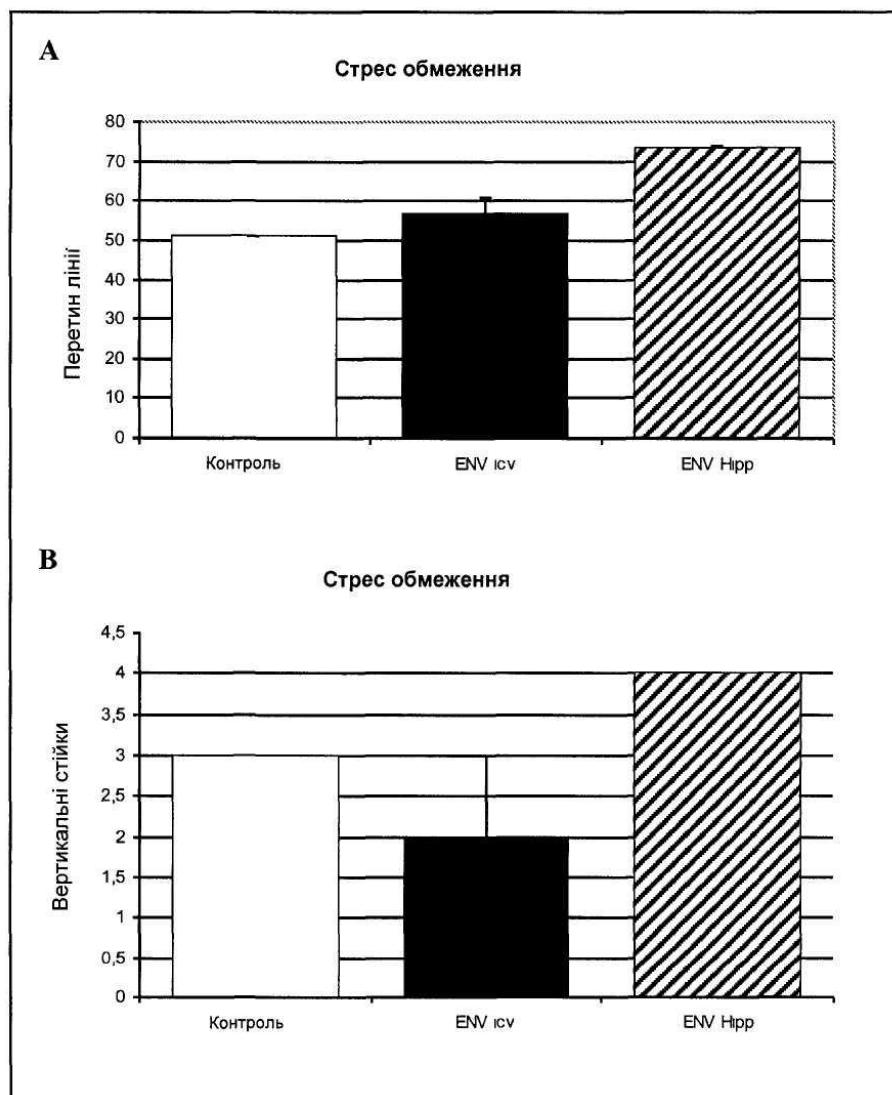
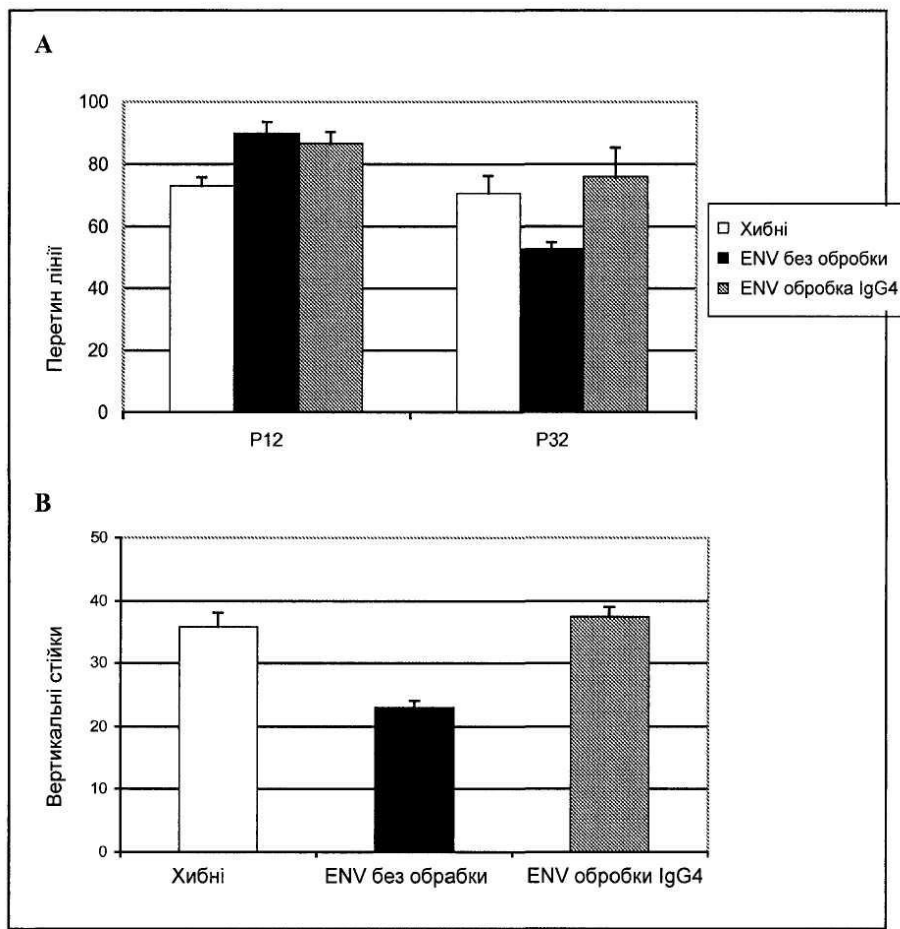


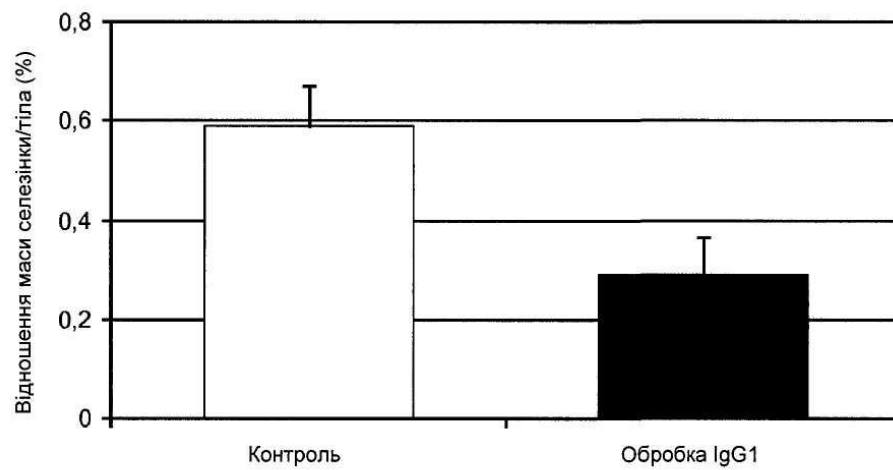
Fig. 28



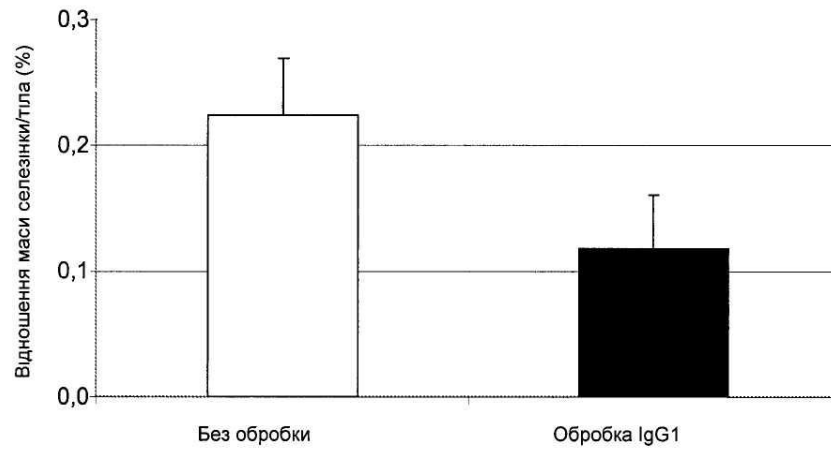
Фіг. 29



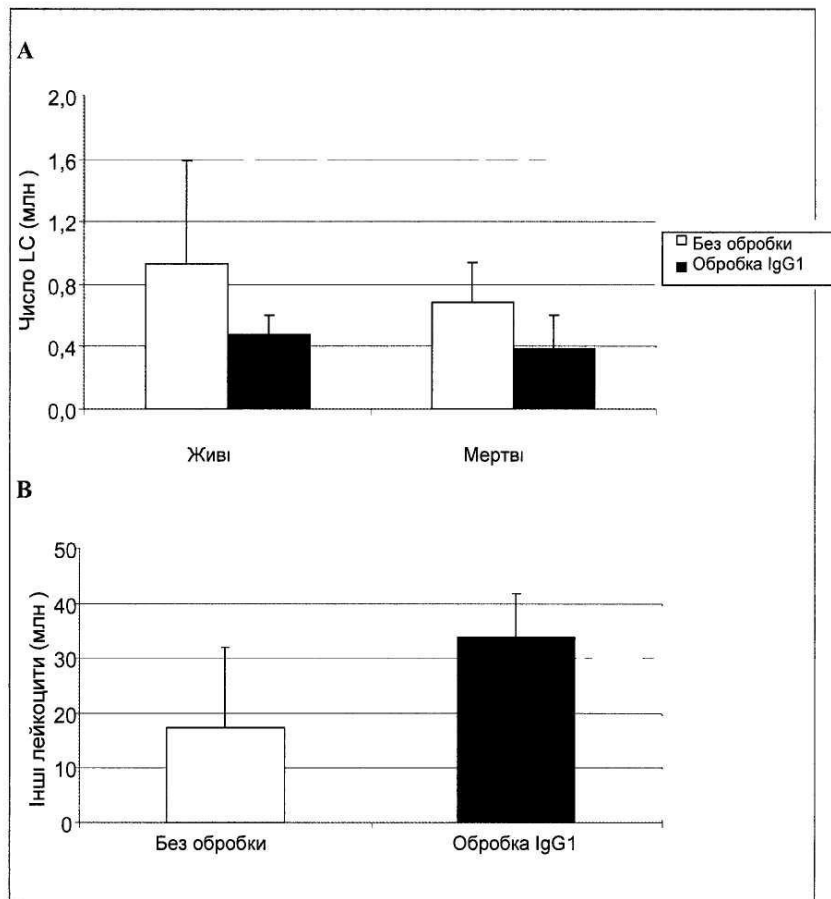
Фіг. 30



Фіг. 31



Фіг. 32



Фіг. 33

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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