

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 542**

51 Int. Cl.:

A61K 39/38 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2014 PCT/EP2014/078969**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015 WO15097140**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2014 E 14833140 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3087100**

54 Título: **Composiciones y métodos terapéuticos**

30 Prioridad:

23.12.2013 US 201361920137 P

26.06.2014 US 201462017457 P

26.06.2014 EP 14174599

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.03.2021

73 Titular/es:

INSTITUT PASTEUR (100.0%)

25-28 Rue du Docteur Roux

75724 Paris Cedex 15, FR

72 Inventor/es:

THEZE, JACQUES;

ROSE, THIERRY y

BUGAULT, FLORENCE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 812 542 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos terapéuticos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para modular el sistema inmunológico en un sujeto que lo necesita. Más en concreto, la invención describe la existencia y la caracterización de un factor endógeno clave de la respuesta inmunológica y proporciona nuevos métodos y composiciones terapéuticos y de diagnóstico basados en la modulación de este factor. En concreto, la invención proporciona composiciones y métodos adecuados para estimular o inhibir las respuestas inmunológicas mediadas por células T CD4 en un sujeto, así como métodos y composiciones para controlar la inmunodeficiencia, incluyendo la inmunodeficiencia asociada con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). También se proporcionan métodos y composiciones para diagnosticar y ensayar defectos en las células T CD4 que persisten después de una terapia antirretrovírica, así como métodos para desarrollar fármacos capaces de tratar específicamente esta inmunodeficiencia.

Introducción

15 Los linfocitos T CD4 desempeñan un papel preeminente en el control del sistema inmunológico (tanto las respuestas celulares como humorales) y son cruciales en diversos trastornos de enfermedad.

Durante la enfermedad inmunológica asociada con la patogénesis del VIH, menos del 0,5% de todas las células T CD4 están realmente infectadas (tal como se mide en la sangre periférica), pero la gran mayoría de las células T CD4 muestran una importante disfunción reguladora. Los linfocitos T CD4 no infectados progresivamente pierden su función, se hacen anérgicos, y su número disminuye dando como resultado una linfopenia de CD4. La anergia y la linfopenia son características de la inmunodeficiencia que caracteriza a los pacientes infectados por VIH. Los mecanismos detrás de estos fenómenos nunca se han terminado de aclarar (1).

20 La activación inmunológica y la inflamación también desempeñan un papel crucial en la patogénesis del VIH (2, 3). Los inventores han demostrado previamente una disminución en la capacidad de respuesta a la interleuquina-2 (IL-2), que conduce a una anergia de CD4 (4) y una reducción en la capacidad de respuesta a la interleuquina-7 (IL-7) que, mediante la alteración del bucle regulador IL-7/CD4, participa en los mecanismos que conducen a linfopenia de CD4 (5). Los mecanismos implicados se han atribuido a defectos en la vía de la quinasa Janus (Jak)/transductor de señales y activador de la transcripción ("Signal Transducer and Activator of Transcription", STAT) (6, 7). Otros laboratorios han obtenido resultados similares (8, 9). A este respecto, es necesaria la compartimentalización del receptor de IL-7 (IL-7R) para iniciar las respuestas de células T CD4 normales (10). Tras la unión de IL-7, las dos cadenas del IL-7R (IL-7R alfa y gamma-c) primero son conducidas hacia el interior de microdominios de membrana ("membrane microdomains", MMD). Estos son compartimentos celulares que, como las balsas lipídicas, son ricos en colesterol y esfingomielina, pero también contienen cantidades muy significativas de proteínas estructurales y funcionales (11). Los complejos de IL-7R inducen una reorganización del citoesqueleto que después interacciona con su red. Estas dos etapas sucesivas son necesarias para el inicio de la vía de Jak/STAT (12).

35 Los presentes inventores han investigado los mecanismos detrás de la falta de respuesta de los linfocitos T CD4 en pacientes infectados por VIH virémicos (VP). Los experimentos proporcionados en la presente demuestran que la activación crónica de los linfocitos T CD4 los conduce a un estado aberrante de activación/diferenciación que hace que sean refractarios a ciertas señales fisiológicas, tales como las enviadas por la interleuquina-7. Además, la presente invención indica la identificación, el aislamiento y la caracterización, a partir de plasma humano, de la proteína responsable de este estado aberrante de activación de las células T CD4. Por primera vez, por tanto, la invención indica que la inmunosupresión puede ser mediada por una proteína endógena en circulación que, tras su expresión, es capaz de inducir la alteración y la inactivación de las células T CD4 y que, tras su inhibición, puede estimular al sistema inmunológico en un sujeto.

45 Basándose en parte en estos notables descubrimientos, la invención ahora proporciona nuevos métodos, composiciones y compuestos para modular el sistema inmunológico, en particular para modular el sistema inmunológico en sujetos con inmunidad alterada (por ejemplo, están inmunodeprimidos o presentan reacciones inmunológicas patológicas). La invención proporciona además nuevos métodos para tratar trastornos inmunológicos mediante la modulación de las células T CD4. La invención es particularmente adecuada para tratar inmunodeficiencias conectadas con una alteración de las células T CD4, tal como el síndrome de inmunodeficiencia asociado con una infección por VIH. La invención también proporciona reactivos y métodos para caracterizar el estado de activación aberrante, la reactividad a la IL7 y/o para controlar la inmunorrespuesta alterada en pacientes infectados por VIH. La respuesta de las células T CD4 puede evaluarse en pacientes no tratados o tratados con fármacos antirretrovíricos y calificar su respuesta al tratamiento, y evaluar la competencia de sus células T CD4.

Sumario de la invención

55 Un objeto de la invención se refiere a un compuesto para su uso según se define en las reivindicaciones.

En la solicitud también se describe un método de tratamiento de un trastorno inmunológico en un sujeto, que comprende exponer el sujeto a un compuesto que modula la cantidad (por ejemplo, la expresión) o la actividad de GIBsPLA2.

5 En la solicitud también se describe el uso de un compuesto que modula la cantidad (por ejemplo, la expresión) o la actividad de GIBsPLA2 para la fabricación de medicamento para modular una respuesta inmunológica o para tratar un trastorno inmunológico en un sujeto.

En la solicitud también se describe un modulador de GIBsPLA2 para su uso en un método para modular una respuesta inmunológica o para tratar un trastorno inmunológico en un sujeto.

10 La invención es particularmente adecuada para tratar sujetos inmunodeficientes o sujetos que necesitan una inmunidad estimulada (por ejemplo, enfermedades infecciosas, cáncer, etc.).

En la solicitud también se describe un método para estimular una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende inhibir GIBsPLA2 en dicho sujeto o exponer el sujeto a un inhibidor de GIBsPLA2.

En la solicitud también se describe un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto, que comprende inhibir GIBsPLA2 en dicho sujeto o exponer el sujeto a un inhibidor de GIBsPLA2.

15 Una realización más concreta de la invención se refiere a un método para tratar el SIDA en un sujeto infectado por VIH, que comprende inhibir GIBsPLA2 en dicho sujeto o exponer el sujeto a un inhibidor de GIBsPLA2.

En la solicitud también se describe un método para estimular el sistema inmunológico de un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método la vacunación del sujeto contra GIBsPLA2.

En la solicitud también se describe un antígeno de GIBsPLA2 para su uso para vacunar a un sujeto que lo necesita.

20 En la solicitud también se describen métodos para diagnosticar la inmunodeficiencia humana asociada con una alteración de las células T CD4. En algunas realizaciones, los métodos comprenden (a) proporcionar una muestra que contiene un fluido corporal, preferiblemente plasma procedente de un sujeto, y (b) detectar la presencia de GIBsPLA2 en la muestra. En algunas realizaciones de los métodos, la inmunodeficiencia es una inmunodeficiencia asociada con una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En algunas realizaciones, el método
25 comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para GIBsPLA2. En algunas realizaciones de los métodos, la presencia de GIBsPLA2 en la muestra se detecta mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

30 En otro aspecto, la invención describe métodos para identificar candidatos a agentes terapéuticos para la inmunodeficiencia. En algunas realizaciones, la inmunodeficiencia está asociada con una alteración en las células T CD4. En algunas realizaciones de los métodos, la inmunodeficiencia humana asociada con una alteración en las células T CD4 está provocada por una infección vírica, en particular una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En algunas realizaciones, los métodos comprenden: (a) poner en contacto linfocitos T CD4 con GIBsPLA2 en presencia de un agente, (b) medir la activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2, y (c) comparar el nivel de activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 en presencia del agente,
35 con el nivel de activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 en ausencia del agente. En algunas realizaciones de los métodos, si el nivel de activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 en presencia del agente es menor que el nivel de activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 en ausencia del agente, entonces el agente se identifica como candidato a agente terapéutico para la inmunodeficiencia. En algunas realizaciones de los métodos, si el nivel de activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 en presencia del agente no es menor que el nivel de activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 en ausencia del agente, entonces el agente se identifica como candidato a agente terapéutico inmunosupresor. En algunas realizaciones, los métodos comprenden medir la activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 mediante la determinación del número de MMD por célula T CD4. En algunas realizaciones, los métodos comprenden medir la activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 mediante la determinación del diámetro promedio de los MMD en células T CD4.
40 En algunas realizaciones, los métodos comprenden medir la activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 mediante la determinación de la capacidad de respuesta a IL-7 de células T CD4.
45

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de GIBsPLA2 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, según se define en las reivindicaciones.

50 En otro aspecto, la invención describe una composición de vacuna que comprende un antígeno de GIBsPLA2 (por ejemplo, una proteína de GIBsPLA2 inmunogénica, o uno de sus fragmentos que contiene un epitopo), un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un adyuvante. En una realización preferida, el antígeno de GIBsPLA2 es una proteína de GIBsPLA2, o uno de sus fragmentos, tratada para (i) aumentar su inmunogenicidad en sujetos humanos y/o (ii) reducir su actividad biológica.

55 La invención puede usarse en cualquier mamífero. Resulta particularmente adecuada para su uso en sujetos humanos. Puede emplearse para aumentar la respuesta inmunológica en cualquier mamífero y está particularmente

adaptada para inducir una potente actividad de células T CD4 en sujetos inmunodeprimidos.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1a a 1e demuestran que, antes de cualquier estimulación, las células T CD4 procedentes de VP muestran un estado de activación aberrante con muchos microdominios de membrana grandes que no se ven afectados por la IL-7.

(a) Los microdominios de membrana (MMD) se marcan con la subunidad B de la toxina del cólera (CtxB-AF488) y se analizan mediante microscopía STED. De arriba abajo, células T CD4 purificados a partir de HD, VP y células T de HD activadas con PHA (40 µg/ml, 30 min). Para cada grupo, se muestra la mitad superior de una célula T CD4 representativa antes y después de una estimulación con IL-7 (2 nM, 15 min) a partir de series de imágenes de apilamiento en Z. Los linfocitos T CD4 también se trataron con colesterol oxidasa (COasa, 31 µM, 25 min) más esfingomielinasa (SMasa, 2,7 µM, 5 min) antes de la estimulación con IL-7.

(b, c) Se contaron los MMD sobre la superficie completa de las células T CD4 purificadas. Se estudió un promedio de 50 células. (b) Células de HD antes (HDc: NS) y después de una estimulación con IL-7 (HDc: IL-7). (c) Células de VP antes (VPc: NS) y después de una estimulación con IL-7 (VPc: IL-7), células de HD activadas con PHA antes (HDc: PHA) y después de una estimulación con IL-7 (HDc: PHA/IL-7).

(d, e) Se midió el tamaño de MMD en la superficie de células T CD4 purificadas (d) células de HD estimuladas con IL-7 (HDc: IL-7), (e) células de VP estimuladas con IL-7 (VPc: IL-7) y células de HD preactivadas con PHA y estimuladas con IL-7 (HDc: IL-7).

Las figuras 2a a 2c demuestran que las cadenas de IL-7R procedentes de células T CD4 de VP están introducidas en microdominios resistentes a detergentes ("detergent-resistant microdomains", DRM) que no se ven afectados por la IL-7. Se lisaron linfocitos T CD4 purificados (Triton X-100 al 0,5%) y se cargaron 200 µl del lisado en un gradiente de sacarosa al 5-40%. Después de 16 h de centrifugación (50 krpm) a 4 °C, se recogieron 18 fracciones (n.º 1 izquierda = tubo superior = sacarosa al 5%; n.º 18 derecha = tubo inferior = sacarosa al 40%). Cada fracción se analizó con SDS-PAGE (acrilamida-bis al 7%). Se detectaron la flotilina, IL-7R alfa y gamma-c mediante inmunotransferencia (10).

(a) Se usó la flotilina como marcador para indicar las fracciones de baja densidad que se corresponden con DRM y las fracciones de alta densidad fuera de las balsas.

(b) Se muestran las bandas de IL-7R alfa y (c) gamma-c para células T CD4 de HD no estimuladas purificadas (HDc: NS), células de HD estimuladas con IL-7 (HDc:IL-7), células de VP no estimuladas (VPc:NS), y células de HD activadas con PHA (HDc:PHA).

Las figuras 3a a 3e demuestran que la función de IL-7R está alterada en los microdominios de membrana de células T CD4 de VP.

(a) Se midieron las tasas de difusión eficaz bidimensional D_{ef} para IL-7R alfa como se revela en la figura 7. También se midieron las tasas de difusión después de añadir diversos fármacos: COasa (31 µM, 30 min) más SMasa (2,7 µM, 5 min) (CO/SM), Col (10 µM, 30 min) más CitD (20 µM, 30 min) (CitD/Col), o en presencia de todos estos inhibidores (todos). Se estudiaron células T CD4 procedentes de HD (HDc) y VP (VPc), así como células T CD4 de HD activadas con PHA (HDc: PHA). Las barras indican PEE para 5 experimentos independientes. En la figura 8 se ofrecen más datos experimentales.

(b) Se realizó la fosforilación inducida por IL-7 y la translocación nuclear de STAT5 usando fosfo-STAT5 de conejo marcados con anti-Atto642 de conejo de cabra y se analizaron mediante microscopía de STED pulsada (cortes de 0,5 µm). Los experimentos implicaron a células T CD4 de HD no estimuladas purificadas (HDc: NS), células T CD4 de HD estimuladas con IL-7 (HDc:IL-7), células T CD4 de VP no estimuladas (VPc:NS), y células T CD4 de VP estimuladas con IL-7 (VPc:IL-7), células T CD4 de HD activadas con PHA (HDc:PHA), y células T CD4 de HD activadas con PHA estimuladas con IL-7 (HDc:PHA/IL-7). En el panel izquierdo se muestran los efectos de la colchicina más citocalasina D.

(c, d, e) Después de la estimulación con IL-7, se midió la cinética de la aparición de fosfo-STAT5 en el citoplasma y la acumulación en el núcleo usando el programa informático ImageJ. (c) Células T CD4 de HD (línea negra) y células T CD4 de HD tratadas con Col más CitD (línea azul), (d) células T CD4 de VP (línea roja) y (e) células T CD4 de HD activadas con PHA (línea verde).

Las figuras 4a a 4d demuestran que el plasma procedente de VP induce un patrón de activación aberrante en células T CD4 de HD, según se mide mediante el número de MMD.

(a) Se muestran imágenes representativas de células T CD4 de HD tratadas con plasma (al 10%) procedente de pacientes VP (HDc: VPP), HIC (HDc: HICp) o ART (HDc: ARTp). Los MMD se tiñeron con la toxina del cólera (CtxB-AF488). Para cada grupo, se muestra la mitad superior de una célula T CD4 representativa procedente de imágenes

de apilamiento en Z antes (izquierda) y después de una estimulación con IL-7 (2 nM, 15 min) (derecha).

(b) MMD inducidos en la superficie de células T CD4 (HDc) por plasmas (al 10%) procedentes de 5 VP diferentes (VPp1 a VPp5). Los resultados se obtuvieron del análisis de 50 células antes (blanco) y después (azul) de una estimulación con IL-7. Se muestran los cuartiles y los valores promedio.

5 (c) Comparación de los efectos de plasmas procedentes de HD (HDp), pacientes VP (VPp), HIC (HICp) y ART (ARTp) después (azul) y antes (blanco) de una estimulación con IL-7.

(d) Dosis (del 0,01% al 10%)-respuesta obtenida con los plasmas descritos en c. Se muestra el número de MMD inducidos en la superficie de células T CD4 HDc. El efecto del plasma de VP se muestra como una línea roja lisa.

10 Las figuras 5a a 5d demuestran que el plasma procedente de VP inhibe la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 y la translocación nuclear de fosfo-STAT5 en linfocitos T CD4 de HD.

(a) Antes de la estimulación con IL-7, las células T CD4 de HD se preincubaron con plasma (al 10%). A la fosforilación inducida por IL-7 y la translocación nuclear de fosfo-STAT5 le siguió una microscopía de STED pulsada (cortes de 0,5 μ m). Se estudiaron los siguientes plasmas (al 10%): control (HDc: NS), pacientes VP (HDc: VPp), HIC (HDc: HICp) y ART (HDc: ARTp).

15 (b) Análisis de fosfo-STAT5 recuperado en el citoplasma (azul) y núcleo (rojo) de células T CD4 de HD estimuladas con IL-7 pretratadas con plasmas procedentes de 5 VP diferentes (al 10%).

(c) Comparación de los efectos de la preincubación del plasma (al 10%) sobre células T CD4 de HD estimuladas con IL-7. El plasma procedía de HD (HDp), pacientes VP (VPp), HIC (HICp) y ART (ARTp)

20 (d) Dosis (0,01%-0%)-respuesta obtenida con los plasmas, medida mediante la inhibición de la translocación nuclear de fosfo-STAT5 en células T CD4 de HD estimuladas con IL-7. El efecto del plasma de VP se muestra como una línea roja lisa.

Las figuras 6a a 6d muestran la caracterización molecular del factor inductor del estado refractario ("Refractory state Inducing Factor", RIF) recuperado a partir de plasma de VP.

25 (a) Tratamiento de plasma de VP con tripsina, DNasa, RNasa y PNGasa. Se siguió la actividad RIF midiendo el número de MMD y los efectos sobre fosfo-STAT5 nuclear inducido por IL-7 en células T CD4 de HD.

30 (b) Se midió el PM de RIF mediante filtración en gel en una columna Sephadex G100. Se siguió la actividad RIF en células T CD4 de HD midiendo el número de MMD inducidos por las diferentes fracciones de la columna (curva roja gruesa). Cada fracción también se ensayó para la presencia de proteínas víricas mediante una transferencia por puntos usando anticuerpos policlonales procedentes de plasma de VP. Se ha restado el fondo obtenido con plasma de HD. Los experimentos se repitieron tres veces.

(c) También se midió el PM de RIF mediante filtración en gel en una columna Sephadex G100, y se siguió su actividad mediante la inhibición de fosfo-STAT5 inducido por IL-7, según se midió mediante FACS. Se registraron los porcentajes del máximo de fosfo-STAT5 inducido por IL-7. También se indica la cantidad de proteína en cada fracción. Los experimentos se repitieron dos veces.

35 (d) Se midió el punto isoeléctrico como sigue. El RIF eluido de la columna Sephadex G100 se cargó en una columna de intercambio aniónico (MonoQ) o catiónico (MonoS). La actividad de RIF se eluyó mediante tampones con pH graduado. Se representó gráficamente el número de MMD en células T CD4 de HD frente al pH.

40 Las figuras 7a a 7c muestran un análisis en gel bidimensional del señalosoma de IL-7 en células T CD4 procedentes de HD, VP y células HD estimuladas con IL-7. (a) Células T CD4 de HD no estimuladas ("non-stimulated", NS). (b) Células T CD4 de VP. (c) Células T CD4 de HD estimuladas con IL-7.

45 Las figuras 8a a muestran un análisis de la tasa de difusión de IL-7Ralfa en la superficie de células T CD4 purificadas procedentes de HD, VP y células HD estimuladas con PHA. (a, d) En la superficie de células T CD4 de HD, (b, e) en la superficie de células T CD4 de VP, (c, f) en la superficie de células T CD4 de HD preactivadas con PHA (1 μ g/ml). (g) Esquema del mecanismo de la difusión de IL-7Ralfa introducidas en MMD antes y después de un tratamiento con inhibidores de MMD o inhibidores del citoesqueleto.

50 Las figuras 9a a 9d muestran una representación esquemática del modo de acción hipotético de RIF sobre células T CD4 de HD y el mecanismo de la falta de respuesta a IL-7. El RIF induce MMD anómalos que no son funcionales. Por tanto, el señalosoma de IL-7 se altera, y las células siguen sin responder a la citoquina, al igual que en las células T CD4 de VP. Los patrones de activación aberrante y los defectos de señalización en células T CD4 de HD inducidas por RIF y en células T CD4 de VP son indistinguibles. La parte izquierda del esquema ilustra las diferentes etapas en los mecanismos de la transducción de señales de IL-7 en HD (10, 12).

(a) En células T CD4 en reposo, antes del reconocimiento de IL-7, las cadenas de IL-7R están asociadas, pero sus

dominios intracitoplásmicos están muy separados, y las moléculas de señalización Jak1 y Jak3 no están interactuando.

- 5 (b) En células T CD4 activadas con IL-7, el IL-7R se compartimentaliza en MMD normales (90 nm de diámetro) y el señalosoma se hace funcional. Después de la organización del citoesqueleto, STAT5A y STAT5B se fosforilan en contacto con los complejos de IL-7R/Jak1/Jak3, y después migran al núcleo moviéndose a lo largo de los microtúbulos, tal como se ha analizado previamente (12).

La parte derecha del esquema ilustra el mecanismo de acción hipotético de RIF. El mecanismo de acción propuesto se deriva de datos preliminares y la comparación de los defectos inducidos por RIF con las alteraciones caracterizadas en células T CD4 procedentes de VP (datos no publicados).

- 10 (c) El RIF induce muchos MMD grandes anómalos. Los IL-7R se introducen en MMD anómalos y se altera su capacidad para inducir un señalosoma funcional.

(d) Las células T CD4 de HD tratadas con RIF no responden a IL-7. Jak1 y Jak3 fosforilan a STAT5, aunque con cinética reducida, pero fosfo-STAT5 no migra al núcleo debido a la falta de organización del citoesqueleto y de los microtúbulos.

- 15 Los paneles a, b, c y d muestran imágenes de microscopía de STED de MMD marcados con CtxB: AF488 (la mitad de la pila del apilamiento en Z procedente de CW-STED). Los paneles b y d muestran tubulina teñida con antitubulina de conejo/anti-Atto642 de conejo de cabra, actina teñida con antiactina de ratón/anti-Chr494 de ratón de cabra, y fosfo-STAT5 teñido con anti-fosfo-STAT5 de conejo/anti-Atto642 de conejo de cabra. La microscopía de STED pulsada muestra un corte de 0,5 µm de células T CD4 permeabilizadas con metanol. Después de la estimulación con IL-7, la actina en el área citoplásmica de MMD de linfocitos T CD4 de HD tratados con RIF no se concentra en forma de almohadillas estructuradas y no forma una corteza que rodea al núcleo, a diferencia de lo que sucede en HD. Además, la tubulina en estas células T CD4 de HD tratada con RIF, al igual que en células T CD4 de VP, no forma microtúbulos, sobre los cuales se ha establecido la hipótesis de que son varillas cruciales que forman puentes entre el citoplasma y la membrana nuclear y, por tanto, son fundamentales para la translocación nuclear de STAT5.

- 25 Resumen de los defectos: Los números dentro de círculos 1, 2, 3 y 4 indican las diferentes etapas defectuosas relacionadas con el patrón de activación aberrante y la falta de respuesta a IL-7 en células T de HD tratadas con RIF: (1) patrón de proteínas anómalo de complejos de señalización, según se describe mediante geles bidimensionales, (2) estructuras de membrana anómalas, tales como MMD grandes, tal como puede observarse mediante microscopía de STED, (3) organización del citoesqueleto anómala, según se mide mediante cinética de difusión y microscopía de STED, y (4) intermedios de señalización anómalos e inhibición de la translocación nuclear de fosfo-STAT5, tal como se demuestran mediante microscopía de STED.

- 35 Figura 10: PLA2sGIB inhibe la translocación nuclear de PStat5 inducida por IL-2 en células T CD4 de donantes sanos ("healthy donors", HD): Células T CD4 en reposo purificadas a partir de 4 donantes sanos se trataron durante 30 minutos a 37 °C con 3% o 1% de plasma procedente de 5 VP (VP63, VP68, VP69, VP74 y VP75) y de 3 HD, usados como control. Cuando se indica, se estimularon con IL-2 2 nM durante 15 minutos a 37 °C. Se muestra el porcentaje de células positivas para PStat5 nuclear, con el promedio y la DE, en células T CD4 completas (a) y en células T CD4+ CD25+ (b), antes (puntos azules) y después de una estimulación con IL-2 (puntos rojos). Se observó la localización intracelular de PStat5 usando microscopía confocal de barrido de láser (LSM 700, Zeiss) después de una tinción indirecta con anti-PStat5 humano de conejo (pY694), seguido de anti-IgG-Die light 405 de conejo de burro. Las células T CD4 totales se tiñeron con anti-β-tubulina humana de cabra, seguido de anti-IgG-AF555 de cabra de burro. Las células T CD4 CD25+ se localizaron con anti-CD25 humana de ratón, seguido de anti-IgG-AF488 de ratón de burro.

- 45 Figura 11: PLA2sGIB inhibe la translocación nuclear de PStat6 inducida por IL-4 en células T CD4 de donantes sanos (HD): Células T CD4 en reposo purificadas a partir de 4 donantes sanos se trataron durante 30 minutos a 37 °C con 3% o 1% de plasma procedente de 5 VP (VP63, VP68, VP69, VP74 y VP75) y de 3 HD, usados como control. Cuando se indica, se estimularon con IL-4 2 nM durante 15 minutos a 37 °C. Se muestra el porcentaje de células positivas para PStat6 nuclear, con el promedio y la DE, en células T CD4 completas, antes (puntos azules) y después de una estimulación con IL-2 (puntos rojos). Se observó la localización intracelular de PStat6 usando microscopía confocal de barrido de láser (LSM 700, Zeiss) después de una tinción indirecta con anti-PStat6 humano de conejo (pY694), seguido de anti-IgG-AF488 de conejo de cabra. Las células T CD4 totales se tiñeron con anti-α-tubulina humana de ratón, seguido de anti-IgG-AF647 de ratón de cabra.

Figura 12: Ausencia de actividad de pPLA2GIB H48Q mutante.

- 55 Figura 13: Comparación de la actividad de PLA2 GIB porcino clonado de tipo salvaje y de su mutante H48Q. A: Inducción de microdominios de membrana anómalos ("abnormal Membrane Microdomains", aMMD); B: Efecto de la translocación nuclear inducida por IL-7 de fosfo-STAT5 (NT de pSTAT5).

La figura 14 muestra el tratamiento de plasma procedente de pacientes virémicos con anticuerpos anti-PLA2 GIB de cabra acoplados con esferas de Sepharose. Verde: VP68; rosa: VP69; azul: VP LJT. Después de un tratamiento (30 min a temperatura ambiente), los plasmas se ensayaron:

- 5 a. Se midió el porcentaje de células T CD4 que muestran MMD anómalos/célula después de una tinción con la toxina B del cólera (CtxB-AF488).
- b. Se midió la translocación nuclear de pSTAT5 después de una estimulación con IL-7 y se contó el porcentaje de núcleos positivos.

Figura 15: Efecto de los anticuerpos anti-PLA2 GIB sobre la inducción de aMMD y la inhibición de NT pSTAT5.

10 Figura 16: El receptor de PLA2G1B soluble de ratón (sMR) inhibe la actividad de PLA2G1B humano (huPLA2G1B) sobre la respuesta a IL-7 de células T CD4 procedentes de donantes sanos, expresado como el porcentaje de células positivas a la translocación nuclear de PStat5. El restablecimiento de la respuesta se calcula como:

$$100 \times (\% \text{ de células positivas}_{\text{ShuGIB+sMR}} - \% \text{ de células positivas}_{\text{ShuGIB}}) / (\% \text{ de células positivas}_{\text{medio de cultivo}} - \% \text{ de células positivas}_{\text{ShuGIB}})$$

15 La figura 17 demuestra que el plasma procedente de pacientes que no responden a CD4 (CD4-NR) induce MMD aberrantes en células T CD4 de HD. (a) Imágenes de células T CD4 de HD tratadas con plasma (al 1%) procedente de un paciente CD4-NR obtenidas usando microscopía de iluminación estructurada ("Structured Illumination Microscopy", SIM). Los MMD se tiñeron con toxina B del cólera (CtxB-AF488). Se muestra una proyección de imágenes de apilamientos en Z de una célula T CD4 representativa. Después de la estimulación con IL-7 (2 nM, 15 min) no se produjo ninguna modificación de la imagen (derecha), (b) Curva de dosis-respuesta (del 0,0001% al 1%) obtenida con plasmas procedentes de 5 pacientes CD4-NR (curva azul, promedio y DE) y de un paciente virémico representativo (curva roja). El número de MMD anómalos inducidos en la superficie de células T CD4 de HD.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para modular el sistema inmunológico en un sujeto que lo necesita. Más en concreto, la invención describe la identificación de GIBsPLA2 como factor endógeno clave de la respuesta inmunológica y proporciona nuevos métodos y composiciones terapéuticos y de diagnóstico basados en la modulación de este factor.

30 Una hipótesis de la presente invención es que la activación crónica del sistema inmunológico en pacientes infectados por VIH es anómala y conduce a las células T CD4 a un estado aberrante de activación/diferenciación que no responde a las citoquinas gamma-c implicadas en el control de muchos aspectos de las defensas inmunológicas y la homeostasis del compartimento de CD4, a pesar del hecho de que más del 99,5% de las células T CD4 procedentes del compartimento periférico no están infectadas. Esta hipótesis fue evaluada por los inventores, y la presente invención aclara la naturaleza y la importancia de este estado de activación aberrante.

35 De modo más específico, en un primer aspecto, la presente invención demuestra que las características de este estado pueden resumirse como sigue: 1) antes de cualquier estimulación, todas las células T CD4 en pacientes infectados por VIH virémicos (VP) poseen numerosos MMD grandes sobre su superficie, 2) estos MMD anómalos secuestran todas las cadenas IL-7Ralfa y gamma-c de las células, y 3) este secuestro de las cadenas en MMD anómalos altera su capacidad para inducir la formación de un señalosoma funcional, 4) esto conduce a un frenado y una reducción de la fosforilación de STAT5, y 5) una reducción de la importación nuclear de fosfo-STAT5. Este patrón anómalo de MMD preexistentes sobre la superficie de linfocitos T CD4 de VP tiene múltiples consecuencias y es un mecanismo básico que explica las diversas manifestaciones de la inmunodeficiencia en pacientes infectados por VIH. La pérdida de respuesta a IL-7 es un factor importante que explica parcialmente la linfopenia de CD4 observada. La pérdida persistente de estas células en VP (debido a su sensibilidad a la apoptosis y su destrucción por la proliferación a bajo nivel, pero continua, de virus) no puede compensarse a pesar de los mayores niveles de IL-7. Además, puesto que los MMD anómalos secuestran todas las cadenas gamma-c en un estado no funcional, esto bloquea la función de las otras citoquinas en esta familia.

45 La presente invención describe además la identificación del factor endógeno clave responsable de este estado anómalo del sistema inmunológico en sujetos infectados y, más en general, responsable de una drástica modulación de la respuesta inmunológica en diversos trastornos patofisiológicos. En efecto, las muestras de plasma procedentes de VP demostraron contener una actividad (denominada RIF) que es capaz de inducir una activación aberrante de linfocitos T CD4 de donantes sanos (HD). Se encontró RIF en todas las muestras de plasma de los VP examinados. La importancia patofisiológica de esta actividad se demuestran por su ausencia en pacientes controladores de VIH ("HIV Controller", HIC), en los que el sistema IL-7/IL-7R es normal y la activación inmunológica es beneficiosa. El RIF también está ausente del plasma de pacientes ART que tienen disminuida su activación inmunológica, una función de IL-7R restablecida y unos recuentos de CD4 recuperados $> 500 / \text{mm}^3$ (5).

55 Por tanto, RIF representa un factor importante que controla la respuesta inmunológica, en particular a través de la modulación de los linfocitos T CD4. Resulta notable que RIF induce un patrón de activación aberrante en células T

CD4 de HD que es indistinguible del observado directamente *ex vivo* en células T CD4 de VP purificadas. La invención también demuestra que RIF es la fosfolipasa A2 segregada del grupo I B ("PLA2 GIB"). Los resultados descritos en esta solicitud demuestran que (i) la sobreexpresión de PLA2 GIB conduce a una potente inmunosupresión, y que (ii) la inhibición de PLA2 GIB conduce a un notable aumento o estimulación de la función inmunológica. Los inhibidores de GIBsPLA2 fueron capaces de corregir el estado inapropiado de las células inmunológicas en plasma procedente de sujetos y, por tanto, pueden usarse para tratar (por ejemplo, prevenir, corregir) la inmunodeficiencia o los trastornos inmunológicos en mamíferos. La inhibición de GIBsPLA2 también puede inducir, estimular o ayudar a mantener los recuentos y la función de células T CD4 y, con ello, ayudar a estimular respuestas inmunológicas eficaces en pacientes. En particular, en pacientes infectados por VIH, puede no administrarse ART, o puede suspenderse, cuando se alcanza un equilibrio entre las defensas inmunológicas del paciente y el virus. Si existe ART, administrado en momentos muy tempranos después de la infección, tal como sugieren estudios recientes, y se combina con inhibidores de RIF, esto podría evitar cualquier alteración inducida por RIF del sistema inmunológico. Además, en el contexto de algunos fracasos actuales de ART, los pacientes con bajos recuentos de CD4 después de ART prolongada pueden beneficiarse de estos inhibidores. Por consiguiente, la invención proporciona métodos para tratar un sujeto mediante la modulación de la expresión o actividad de GIBsPLA2 en el sujeto. Más en concreto, la invención proporciona un método para modular una respuesta inmunológica en un sujeto que lo necesita, que comprende modular la actividad o la expresión de GIBsPLA2 en dicho sujeto.

Los datos proporcionados en los ejemplos también demuestran que la presencia de RIF en el plasma de un sujeto indica el estado de patogénesis inducido por VIH de las células T CD4. Por consiguiente, la invención proporciona métodos para controlar y/o diagnosticar una infección por VIH en un sujeto mediante la detección del nivel de RIF en el plasma del sujeto, entre otras cuestiones.

Los datos proporcionados en los ejemplos demuestran además que el número y/o el tamaño de los microdominios de membrana (MMD) en las células T de un sujeto indican el estado de patogénesis inducido por VIH de las células T CD4. Por consiguiente, esta descripción proporciona además métodos para controlar y/o diagnosticar una infección por VIH en un sujeto mediante la medición del número y/o tamaño de los microdominios de membrana (MMD) en las células T del sujeto, entre otras cuestiones.

Los datos proporcionados en los ejemplos también indican un papel del RIF en la creación y/o el mantenimiento del estado de enfermedad de células T CD4 en sujetos infectados por VIH. Por consiguiente, esta descripción proporciona además métodos para identificar un candidato a agente terapéutico para el VIH que incluyen medir la activación de células T CD4 inducida por RIF en presencia de un agente. En algunas realizaciones, los métodos comprenden comparar el nivel de activación de células T CD4 inducida por RIF en presencia del agente con el nivel de activación de células T CD4 inducida por RIF en ausencia del agente.

Definiciones

La expresión "identidad de secuencia", aplicada a secuencias de ácidos nucleicos o proteínas, se refiere a la cuantificación (normalmente, porcentaje) de correspondencias de nucleótidos o restos aminoácidos entre al menos dos secuencias alineadas usando un algoritmo estandarizado, tal como el alineamiento Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981), *J. Mol. Biol.*, 147:195-197), CLUSTALW (Thompson *et al.* (1994), *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680), o BLAST2 (Altschul *et al.* (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). Puede emplearse BLAST2 de una manera estandarizada y reproducible para insertar huecos en una de las secuencias para optimizar el alineamiento y para lograr una comparación más significativa entre ellas.

Tal como se emplea en la presente, "tratamiento" o "tratar" se refiere a una intervención clínica para intentar alterar el desarrollo natural del individuo que se está tratando, y este puede realizarse con fines preventivos o curativos. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a evitar la aparición o la recurrencia de una enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de avance de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de enfermedad, y la remisión o una mejor prognosis. En algunas realizaciones, las composiciones y los métodos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o un trastorno o para frenar el avance de una enfermedad o un trastorno.

El término "aislado", tal como se emplea en la presente, se refiere a moléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos o aminoácidos) que se retiran de un componente de su entorno natural, se aíslan o se separan, y que están al menos 60% exentas, preferiblemente 75% exentas y lo más preferiblemente 90% exentas de otros componentes con los que están asociados en la naturaleza. Un polipéptido (o proteína) "aislado" es, por ejemplo, un polipéptido separado de un componente de su entorno natural y, preferiblemente, purificado hasta más del 90% o 95% de pureza según se determina, por ejemplo, mediante migración electroforética (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico ("isoelectric focusing", IEF), electroforesis capilar) o cromatográfica (por ejemplo, HPLC de fase inversa o de intercambio iónico). Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico separada de un componente de entorno natural y/o ensamblada en una construcción diferente (por ejemplo, un vector, módulo de expresión, hospedante recombinante, etc.).

Un "ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-GIBsPLA2" se refiere a una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras (o sus fragmentos), incluyendo dichas una o más moléculas de ácidos nucleicos en un único vector o en vectores distintos y dichas una o más moléculas de ácidos nucleicos presentes en una o más localizaciones en una célula hospedante.

5 Un "sujeto" se refiere a un mamífero. Los ejemplos de mamíferos incluyen seres humanos y animales no humanos, tales como, sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates no humanos (tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas).

10 La "modulación de una respuesta inmunológica" indica, dentro del contexto de la invención, cualquier modificación de la cantidad o la actividad o la proporción de células inmunológicas, preferiblemente leucocitos (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, NK, células NKT, macrófagos, células dendríticas). En una realización particular, la modulación de una respuesta inmunológica incluye la modulación de la cantidad o la actividad de linfocitos T, preferiblemente linfocitos T CD4.

Factor inductor del estado refractario (RIF) o fosfolipasa A2 del grupo IB

15 El término RIF se usa de modo intercambiable con fosfolipasa A2 del grupo IB, GIBsPLA2 (o PLA2 GIB). La fosfolipasa A2 del grupo IB es una proteína segregada que tiene un PM de aproximadamente 15 kDa y un punto isoeléctrico de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,0.

20 Dentro del contexto de la presente invención, el término "GIBsPLA2" o la expresión "fosfolipasa A2 del grupo IB" indica cualquier proteína de GIBsPLA2 nativa procedente de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término incluye GIBsPLA2 no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de GIBsPLA2 que surge del procesamiento dentro o fuera de una célula. El término también incluye los variantes naturales de GIBsPLA2, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas.

A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de un ejemplo de GIBsPLA2 humana (SEQ ID NO:2).

MKLLVLAVLL TVAAADSGIS **PRAVWQFRKM** IKCVIPGSDP FLEYNNYGCY
CGLGGSGTPV DELDKCCQTH DNCYDQAKKL DCKFLLDNP YHTYSYSCS
GSAITCSSKN KECEAFICNC DRNAAICFSK APYNKAHKNL DTKKYCQS

25 Los aminoácidos 1 a 15 de SEQ ID NO:2 (subrayados) son una secuencia señal, y los aminoácidos 16 a 22 de SEQ ID NO:2 (en negrita) son una secuencia de propéptido. La proteína madura se corresponde con los restos aminoácidos 23-148 de SEQ ID NO:2, que es un ejemplo de proteína de GIBsPLA2 humana procesada.

30 Los variantes naturales incluyen cualquier proteína que comprende la secuencia de SEQ ID NO:2, o la secuencia de los restos aminoácidos 23-148 de SEQ ID NO:2, con una o más de sustituciones, adiciones y/o deleciones de uno o varios restos aminoácidos (generalmente, 1, 2 o 3), preferiblemente no más de 10 sustituciones, adiciones y/o deleciones diferentes de uno o varios (generalmente, 1, 2 o 3) restos aminoácidos. Los variantes naturales típicos conservan una actividad biológica de SEQ ID NO:2.

35 A este respecto, en algunas realizaciones, GIBsPLA2 presenta al menos una actividad seleccionada de la inducción de la formación de microdominios de membrana (MMD) en células T CD4 procedentes de sujetos sanos, o hacer que las células T CD4 de sujetos sanos sean refractarias a la señalización de interleuquinas, tales como refractarias a la señalización de IL-2 o refractarias a la señalización de IL-7.

40 En algunas realizaciones, la inducción de la formación de MMD comprende aumentar el número de MMD en células T CD4 de sujetos sanos hasta al menos aproximadamente 80 por célula, al menos aproximadamente 90 por célula, al menos aproximadamente 100 por célula, al menos aproximadamente 110 por célula, o al menos aproximadamente 120 por célula. En una realización preferida no limitante, la inducción de la formación de MMD comprende aumentar el número de MMD en células T CD4 de sujetos sanos hasta más de 100 MMD por célula.

45 En algunas realizaciones, la inducción de la formación de MMD comprende estimular la formación de MMD más grandes que los que estarían presentes de otro modo sobre las células T CD4. En algunas realizaciones, la inducción de la formación de MMD más grandes comprende estimular la formación de MMD que tienen un diámetro de al menos 100 nm, al menos 110 nm, al menos 120 nm, al menos 130 nm, o al menos 140 nm. En una realización preferida no limitante, la inducción de la formación de MMD más grandes comprende estimular la formación de MMD con un diámetro mayor que 120 nm.

En algunas realizaciones, hacer que las células T CD4 de sujetos sanos sean refractarias a la señalización de interleuquina-7 comprende una reducción de la fosforilación de STAT5A y/o B en dichas células en al menos

5 aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, o al menos aproximadamente 40%. En algunas realizaciones, hacer que las células T CD4 de sujetos sanos sean refractarias a la señalización de interleuquina-7 comprende reducir la tasa de translocación nuclear de fosfo-STAT5A y/o fosfo-STAT5B en al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, o al menos aproximadamente 50%.

La actividad GIBsPLA2 puede medirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como se ilustra en los ejemplos o desarrollado después. La actividad GIBsPLA2 puede medirse en una muestra de plasma, tal como, por ejemplo, una muestra de plasma fraccionada, usando, por ejemplo, ensayos de reclutamiento de ligandos, inmunoensayos y/o ensayos enzimáticos.

10 En una realización particular, el término GIBsPLA2 indica una proteína humana, en particular una proteína que comprende SEQ ID NO:2, o uno de sus variantes naturales.

La GIBsPLA2 según esta descripción puede estar aislada, purificada y/o ser recombinante. En ciertas realizaciones, la invención puede usar, en lugar de una proteína de GIBsPLA2 o además de esta, un ácido nucleico que codifica GIBsPLA2. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN, monocatenario o bicatenario.

15 Un ejemplo de secuencia de ácido nucleico que codifica GIBsPLA2 se muestra en SEQ ID NO:1, a continuación.

```

ATGAAACTCCTTGTGCTAGCTGTGCTGCTCACAGTGGCCGCCGCCGACAGCGGCATCAGC
CCTCGGGCCGTGTGGCAGTTCCGCAAAATGATCAAGTGCGTGATCCCGGGGAGTGACCCC
TTCTTGGAATACAACAACACTACGGCTGCTACTGTGGCTTGGGGGGCTCAGGCACCCCCGTG
GATGAACTGGACAAGTGCTGCCAGACACATGACAACCTGCTACGACCAGGCCAAGAAGCTG
GACAGCTGTAAATTTCTGCTGGACAACCCGTACACCCACACCTATTCATACTCGTGCTCT
GGCTCGGCAATCACCTGTAGCAGCAAAAACAAAGAGTGTGAGGCCTTCATTTGCAACTGC
GACCGCAACGCTGCCATCTGCTTTTCAAAGCTCCATATAACAAGGCACACAAGAACCTG
GACACCAAGAAGTATTGTCAGAGTTGA
    
```

20 Otras moléculas de ácidos nucleicos que codifican una GIBsPLA2 incluyen cualquier variante de SEQ ID NO:1 que surge de la degeneración del código genético, así como cualquier secuencia que se hibrida con SEQ ID NO:1 bajo condiciones rigurosas, más preferiblemente que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95% o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1, y que codifica una proteína de GIBsPLA2.

Método de producción de GIBsPLA2

25 La GIBsPLA2 puede producirse mediante cualquier método de expresión de proteínas y método de purificación conocidos convencionalmente. Por ejemplo: (i) un método para sintetizar péptidos; (ii) un método para purificarlos y aislarlos a partir del cuerpo vivo o de células cultivadas; o (iii) un método para producirlos con el uso de técnicas de recombinación genética; y sus combinaciones y similares (por ejemplo, las técnicas convencionales descritas, por ejemplo, en Molecular Cloning (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press) (1989), y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F. M., John Wiley and Sons, Inc. (1989)).

30 En una realización particular, la invención se refiere a un método para producir GIBsPLA2 mediante la expresión de un ácido nucleico codificador en una célula hospedante, y la recolección o purificación de la GIBsPLA2. A este respecto, la invención también describe células hospedantes recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica una GIBsPLA2. Estas células pueden ser procariotas (tales como bacterias) o eucariotas (tales como células de levadura, células de insecto, células vegetales o células de mamífero). El ácido nucleico puede colocarse bajo el control de cualquier secuencia reguladora adecuada, tal como un promotor, un terminador y similares. Como alternativa, el ácido nucleico puede insertarse en la célula hospedante en una localización en la que la expresión es dirigida por un promotor endógeno. Las técnicas para insertar ácidos nucleicos en células son muy conocidas en la técnica.

Modulación de GIBsPLA2

40 La invención proporciona nuevos métodos que comprenden la modulación de GIBsPLA2 en un sujeto que lo necesita. El término "modulación" indica cualquier modificación del nivel (por ejemplo, expresión) o actividad de GIBsPLA2 en un sujeto. Además, la modulación indica un aumento o una disminución de la actividad o nivel GIBsPLA2. Más preferiblemente, la modulación indica un cambio en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%,

70%, 80% o más, comparado con una situación no modulada. Como resultado, la inhibición de GIBsPLA2 indica reducir en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más la actividad o el nivel de GIBsPLA2, así como bloquear o suprimir completamente la actividad o el nivel de GIBsPLA2. A la inversa, la estimulación de GIBsPLA2 indica aumentar en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más la actividad o el nivel de GIBsPLA2. Dependiendo de la situación, la modulación puede ser transitoria, sostenida o permanente. Además, la modulación de la actividad incluye modular la cantidad de GIBsPLA2 en el sujeto, en particular en fluidos corporales, modular la potencia de la proteína (por ejemplo, mediante la modulación del nivel de cofactores o del sustrato en el sujeto), y modular la actividad o el nivel de los productos de degradación producidos por GIBsPLA2.

Inhibición de GIBsPLA2

En una realización particular, la invención proporciona composiciones y métodos para inhibir GIBsPLA2 en un sujeto. La inhibición de GIBsPLA2 puede obtenerse mediante el uso de inhibidores de GIBsPLA2, es decir, cualquier compuesto que inhiba la expresión o la actividad de GIBsPLA2. Los inhibidores de GIBsPLA2 incluyen inhibidores de la expresión, antagonistas, secuestradores, o compuestos que enmascaran la diana. Los tipos de inhibidores de GIBsPLA2 preferidos incluyen ligandos de GIBsPLA2 (covalentes o no covalentes), anticuerpos anti-GIBsPLA2 (y sus fragmentos y derivados), ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-GIBsPLA2 (o sus fragmentos y derivados), ácidos nucleicos inhibidores, péptidos, o fármacos pequeños, o sus combinaciones. Como alternativa, o además, la inhibición de GIBsPLA2 puede obtenerse vacunando un sujeto contra un antígeno de GIBsPLA2, de modo que son producidos anticuerpos por el sujeto que necesita una inhibición de PLA2-GIB.

Anticuerpos contra GIBsPLA2

Los ejemplos específicos de inhibidores GIBsPLA2 son anticuerpos que se unen específicamente a GIBsPLA2.

Los anticuerpos pueden ser sintéticos, monoclonales o policlonales, y pueden prepararse mediante técnicas muy conocidas en la técnica. Estos anticuerpos se unen específicamente a través de sitios de unión al antígeno del anticuerpo (en oposición a la unión no específica). Los polipéptidos, fragmentos, variantes, proteínas de fusión, etc., de GIBsPLA2 pueden emplearse como inmunógenos en la producción de anticuerpos que inmunorreaccionan con ellos. De modo más específico, los polipéptidos, fragmentos, variantes, proteínas de fusión, etc., contienen determinantes antigénicos o epitopos que suscitan la formación de anticuerpos.

Estos determinantes antigénicos o epitopos puede ser lineales o conformacionales (discontinuos). Los epitopos lineales están compuestos de una única sección de aminoácidos del polipéptido, mientras que los epitopos conformacionales o discontinuos están compuestos de secciones de aminoácidos procedentes de diferentes regiones de la cadena del polipéptido que se aproximan tras el plegamiento de la proteína (C. A. Janeway, Jr. y P. Travers, *Immuno Biology*, 3:9 (Garland Publishing Inc., 2ª ed., 1996)). Debido a que las proteínas plegadas tienen superficies complejas, el número de epitopos disponibles es bastante numeroso; sin embargo, debido a la conformación de la proteína y a impedimentos estéricos, el número de anticuerpos que realmente se unen a los epitopos es menor que el número de epitopos disponibles (C. A. Janeway, Jr. y P. Travers, *Immuno Biology* 2:14 (Garland Publishing Inc., 2ª ed., 1996)). Los epitopos pueden identificarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Pueden prepararse anticuerpos policlonales y monoclonales mediante técnicas convencionales.

Los anticuerpos preferidos de la invención se dirigen a un epitopo de GIBsPLA2 y/o se han generado mediante inmunización con un polipéptido que comprende un epitopo de GIBsPLA2 seleccionado de: la proteína de GIBsPLA2 madura, un fragmento de GIBsPLA2 que comprende al menos 8 restos aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO:2 (o los correspondientes restos de un variante natural de SEQ ID NO:2), y dicho fragmento comprende al menos el aminoácido 70, el aminoácido 121, el aminoácido 50, el aminoácido 52, el aminoácido 54, el aminoácido 71, o una de sus combinaciones. Los anticuerpos de la invención preferidos se unen a un epitopo comprendido entre los restos aminoácidos 50-71 de SEQ ID NO:2 o los correspondientes restos de un variante natural de SEQ ID NO:2.

El término "anticuerpos" pretende incluir anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, sus fragmentos, tales como fragmentos F(ab')₂ y Fab, fragmentos variables monocatenarios (scFv), fragmentos de anticuerpos de dominio único (VHH o nanocuerpos), fragmentos de anticuerpos bivalentes (diacuerpos), así como cualquier compañero de unión producido de modo recombinante y sintético, anticuerpos humanos o anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos se definen como de unión específica preferiblemente si se unen a GIBsPLA2 con una K_a mayor o igual a aproximadamente 10^7 M⁻¹. Las afinidades de los anticuerpos pueden determinarse con facilidad usando técnicas convencionales, por ejemplo, las descritas en Scatchard *et al.*, *Ann. NYAcad. Sci.*, 51:660 (1949).

Los anticuerpos policlonales pueden generarse con facilidad a partir de una diversidad de fuentes, por ejemplo, caballos, vacas, burros, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones o ratas, usando procedimientos muy conocidos en la técnica. En general, la GIBsPLA2 purificada o un péptido basado en la secuencia de aminoácidos de GIBsPLA2 que está conjugado de modo apropiado se administra al animal hospedante generalmente a través de una inyección parenteral. La inmunogenicidad de GIBsPLA2 puede potenciarse mediante el uso de un adyuvante, por ejemplo, adyuvante completo o incompleto de Freund. Después de administrar inmunizaciones de refuerzo, se

recogen pequeñas muestras de suero y se ensayan para la reactividad con el polipéptido de GIBsPLA2. Los ejemplos de diversos ensayos útiles para dicha determinación incluyen los descritos en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; así como procedimientos, tales como la inmunoelectroforesis a contracorriente ("countercurrent immuno-electrophoresis", CIEP), radioinmunoensayos, radioinmunoprecipitación, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos de transferencia por puntos y ensayos de sándwich. Véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 4.376.110 y 4.486.530.

Pueden prepararse con facilidad anticuerpos monoclonales usando procedimientos muy conocidos. Véanse, por ejemplo, los procedimientos descritos en las patentes de EE. UU. n.ºs RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439, y 4.411.993; *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn y Bechtol (eds.), 1980.

Por ejemplo, los animales hospedantes, tales como ratones, pueden ser inyectados por vía intraperitoneal al menos una vez, y preferiblemente al menos dos veces a intervalos de aproximadamente 3 semanas, con una proteína de GIBsPLA2 mutante o de tipo salvaje aislada y purificada o un péptido de GIBsPLA2 conjugado, opcionalmente en presencia de un adyuvante. Después se ensayan los sueros de los ratones mediante una técnica de transferencia por puntos o de captura de anticuerpos (ABC) convencional para determinar el animal que es el mejor para fusionar. Aproximadamente dos a tres semanas más tarde, los ratones reciben un refuerzo intravenoso de proteína o péptido. Después los ratones se sacrifican, y las células del bazo se fusionan con células de mieloma disponibles en el mercado, tales como Ag8.653 (ATCC), siguiendo protocolos establecidos. Brevemente, las células de mieloma se lavan varias veces en medio y se fusionan con células de bazo de ratón a una proporción de aproximadamente tres células de bazo a una célula de mieloma. El agente de fusión puede ser cualquier agente adecuado que se emplea en la técnica, por ejemplo, polietilenglicol (PEG). La fusión se cultiva en placas que contienen un medio que permita el crecimiento selectivo de las células fusionadas. Después se deja que las células fusionadas crezcan durante aproximadamente ocho días. Se recogen los sobrenadantes de los hibridomas resultantes y se añaden a una placa que se ha revestido en primer lugar con anti-Ig de ratón de cabra. Después de unos lavados, se añade un marcador, tal como un polipéptido de GIBsPLA2 marcado, a cada pocillo, seguido de una incubación. Posteriormente pueden detectarse los pocillos positivos. Los clones positivos pueden cultivarse en un cultivo en masa y después los sobrenadantes se purifican en una columna de proteína A (Pharmacia).

Los anticuerpos monoclonales de la descripción pueden producirse usando técnicas alternativas, tales como las descritas en Altling-Mees *et al.*, "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", *Strategies in Molecular Biology*, 3:1-9 (1990). De modo similar, pueden construirse compañeros de unión usando técnicas de ADN recombinante para incorporar las regiones variables de un gen que codifica un anticuerpo de unión específica. Esta técnica se describe en Larrick *et al.*, *Biotechnology*, 7:394 (1989).

Los fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos, que pueden producirse mediante técnicas convencionales, también se incluyen en la presente invención. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen, pero no se limitan a fragmentos Fab y F(ab')₂. También se proporcionan fragmentos de anticuerpos y derivados producidos mediante técnicas de ingeniería genética.

Los anticuerpos monoclonales de la presente descripción incluyen anticuerpos quiméricos, por ejemplo, versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales murinos. Estos anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante técnicas conocidas y ofrecen la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando los anticuerpos se administran a seres humanos. En una realización, un anticuerpo monoclonal humanizado comprende la región variable de un anticuerpo murino (o solo su sitio de unión al antígeno) y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Como alternativa, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal murino y un fragmento de región variable (que carece del sitio de unión al antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y posteriormente modificados incluyen los descritos en Riechmann *et al.* (*Nature*, 332:323, 1988), Liu *et al.* (*PNAS*, 84:3439, 1987), Larrick *et al.* (*Bio/Technology*, 7:934, 1989), y Winter y Harris (*TIPS*, 14:139, mayo de 1993). Pueden encontrarse procedimientos para generar anticuerpos de modo transgénico en el documento GB 2.272.440, y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.569.825 y 5.545.806.

Pueden usarse anticuerpos producidos mediante métodos de ingeniería genética, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones humanas y no humanas, que pueden prepararse empleando técnicas de ADN recombinante convencionales. Estos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante ingeniería genética utilizando técnicas de ADN convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando los métodos descritos en Robinson *et al.*, publicación internacional n.º WO 87/02671; Akira, *et al.*, solicitud de patente europea 0184187; Taniguchi, M., solicitud de patente europea 0171496; Morrison *et al.*, solicitud de patente europea 0173494; Neuberger *et al.*, publicación internacional PCT n.º WO 86/01533; Cabilly *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, solicitud de patente europea 0125023; Better *et al.*, *Science*, 240:1041-1043, 1988; Liu *et al.*, *PNAS*, 84:3439-3443, 1987; Liu *et al.*, *J. Immunol.*, 139:3521-3526, 1987; Sun *et al.*, *PNAS*, 84:214-218, 1987; Nishimura *et al.*, *Canc. Res.*, 47:999-1005, 1987; Wood *et al.*, *Nature*, 314:446-449, 1985; y Shaw *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 80:1553-1559, 1988; Morrison, S. L., *Science*, 229:1202-1207, 1985; Oi *et al.*, *BioTechniques*, 4:214, 1986; Winter, patente de EE. UU. n.º 5.225.539; Jones *et al.*, *Nature*, 321:552-525, 1986; Verhoeyan *et al.*, *Science*, 239:1534, 1988; y Beidler *et al.*, *J. Immunol.*, 141:4053-4060,

1988.

En conexión con los anticuerpos sintéticos y semisintéticos, estas expresiones pretenden cubrir, pero no se limitan a fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de isotipo cambiado, anticuerpos humanizados (por ejemplo, ratón-humano, humano-ratón), híbridos, anticuerpos que tienen varias especificidades, y moléculas similares a anticuerpos totalmente sintéticas.

Para aplicaciones terapéuticas, a menudo se prefieren los anticuerpos monoclonales "humanos" que tienen regiones constantes y variables, para minimizar la respuesta inmunológica de un paciente frente al anticuerpo. Estos anticuerpos pueden generarse inmunizando animales transgénicos que contienen genes de inmunoglobulina humanos. Véase, Jakobovits *et al.*, Ann. NY Acad. Sci., 764:525-535 (1995).

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos contra polipéptidos de GIBsPLA2 construyendo un banco de inmunoglobulinas combinatorio, tal como un banco de presentación de fagos de Fab o un banco de presentación de fagos de scFv, usando ADNc de cadenas pesadas y cadenas ligeras de inmunoglobulinas preparadas a partir de un ARNm derivado de los linfocitos de un sujeto. Véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, publicación PCT WO 92/01047; Marks *et al.* (1991), J. Mol. Biol., 222:581-597; y Griffiths *et al.* (1993), EMBO J., 12:725-734. Además, puede generarse un banco combinatorio de regiones variables de anticuerpos mutando un anticuerpo humano conocido. Por ejemplo, puede mutarse una región variable de un anticuerpo humano conocido por unirse a GIBsPLA2, por ejemplo, usando oligonucleótidos mutagenizados alterados aleatoriamente, para generar un banco de regiones variables mutadas que después puede seleccionarse para la unión a GIBsPLA2. Pueden encontrarse métodos para inducir una mutagénesis aleatoria dentro de las regiones CDR de cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina, métodos para cruzar cadenas pesadas y ligeras aleatorizadas para formar parejas, y métodos de selección, por ejemplo, en Barbas *et al.*, publicación PCT WO 96/07754; Barbas *et al.* (1992), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89:4457-4461.

Un banco de inmunoglobulina puede ser expresado por una población de paquetes de presentación, preferiblemente derivados de fagos filamentosos, para formar un banco de presentación de anticuerpos. Pueden encontrarse ejemplos de métodos y reactivos particularmente adecuados para su uso en la generación de bancos de presentación de anticuerpos, por ejemplo, en Ladner *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.223.409; Kang *et al.*, publicación PCT WO 92/18619; Dower *et al.*, publicación PCT WO 91/17271; Winter *et al.*, publicación PCT WO 92/20791; Markland *et al.*, publicación PCT WO 92/15679; Breitling *et al.*, publicación PCT WO 93/01288; McCafferty *et al.*, publicación PCT WO 92/01047; Garrard *et al.*, publicación PCT WO 92/09690; Ladner *et al.*, publicación PCT WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991), Bio/Technology, 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992), Hum. Antibod. Hybridomas, 3:81-85; Huse *et al.* (1989), Science, 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993), supra; Hawkins *et al.* (1992), J. Mol. Biol., 226:889-896; Clackson *et al.* (1991), Nature, 352:624-628; Gram *et al.* (1992), PNAS, 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991), Bio/Technology, 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991), Nuc. Acid Res., 19:4133-4137; y Barbas *et al.* (1991), PNAS, 88:7978-7982. Tras haber sido presentado sobre la superficie de un paquete de presentación (por ejemplo, un fago filamentosos), el banco de anticuerpos se selecciona para identificar y aislar los paquetes que expresan un anticuerpo que se une a un polipéptido de GIBsPLA2. En una realización preferida, la selección principal del banco implica una inmuoadsorción con un polipéptido de GIBsPLA2 inmovilizado, y se seleccionan los paquetes de presentación que expresan anticuerpos que se unen al polipéptido de GIBsPLA2 inmovilizado.

En una realización particular, la invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo anti-GIBsPLA2 (o uno de sus fragmentos o derivados) y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los anticuerpos monoclonales anti-fosfolipasa A2-GIB existentes incluyen Mab CH-7 (Labome), MAB5018 (Labome), EPR5186 (Genetex); LS-C138332 (Lifespan) o CABT-17153MH (Creative Biomart). Los ejemplos de anticuerpos policlonales incluyen, por ejemplo, N1C3, de GeneTex. Tal como se indicó anteriormente, los anticuerpos anti-GIBsPLA2 de la invención preferidos se unen a GIBsPLA2 madura, aún más preferiblemente a un epítipo comprendido en un dominio de GIBsPLA2 que comprende un aminoácido seleccionado del aminoácido 70, aminoácido 121, aminoácido 50, aminoácido 52, aminoácido 54, aminoácido 71, o sus combinaciones. Los anticuerpos de la invención preferidos se unen a un epítipo comprendido entre los restos aminoácidos 50-71 de SEQ ID NO:2 o los correspondientes restos de un variante natural de SEQ ID NO:2.

En una realización alternativa, la invención se refiere y usa una composición que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-GIBsPLA2 (o uno de sus fragmentos o derivados) y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Ácidos nucleicos inhibidores

La invención también describe ácidos nucleicos inhibidores, es decir, moléculas de ácidos nucleicos que inhiben el gen o la expresión de proteínas de GIBsPLA2. Los ejemplos de ácidos nucleicos inhibidores incluyen ácidos nucleicos antisentido, ARN de interferencia cortos (ARNic), ARN de horquilla pequeños (ARNhp), microARN, aptámeros o ribozimas. En una realización particular, el ácido nucleico inhibidor es un ARN de interferencia pequeño que evita la traducción del ARNm de GIBsPLA2. En otra realización particular, el ácido nucleico inhibidor es un oligonucleótido antisentido que evita la traducción del ARNm de GIBsPLA2. En otra realización particular, el ácido

nucleico inhibidor es un ARN de horquilla pequeño que evita la traducción del ARNm de GIBsPLA2.

5 El ARNip comprende una secuencia de ácido nucleico sentido y una secuencia de ácido nucleico antisentido del polinucleótido de interés. Los ARNip se construyen de tal modo que un único transcrito (ARN bicatenario) tiene la secuencia sentido y antisentido complementaria del gen diana. La secuencia de nucleótidos de los ARNip puede diseñarse usando un programa informático de diseño de ARNip disponible, por ejemplo, en el sitio web de Ambion en la red mundial.

10 En algunas realizaciones, la longitud del oligonucleótido antisentido o ARNip es menor o igual a 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud del oligonucleótido antisentido o ARNip es tan extensa como el transcrito natural. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido y ARNip tienen 18-30 nucleótidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido y ARNip tienen una longitud menor que 25 nucleótidos.

15 Las moléculas de ácidos nucleicos inhibidores ilustrativas comprenden un dominio que tiene una secuencia de nucleótidos que es perfectamente complementaria con una región de un gen o ARN de GIBsPLA2. Este dominio contiene generalmente de 4 a 20 nucleótidos, que permite una hibridación específica y una inhibición óptima de la transcripción del gen o la traducción del ARN. La secuencia de los ácidos nucleicos inhibidores puede derivarse directamente de la secuencia de un gen que codifica GIBsPLA2, tal como SEQ ID NO:1. Como alternativa, o además, los ácidos nucleicos inhibidores pueden hibridarse con un elemento regulador en un gen o ARN de GIBsPLA2, tal como un promotor, un sitio de corte y empalme, y evitar su regulación eficaz.

20 Los ejemplos específicos de moléculas de ácidos nucleicos inhibidores descritas en la presente invención incluyen moléculas de ácidos nucleicos monocatenarios aisladas que consisten en 10 a 50 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO:1. Los ejemplos específicos de moléculas de ácidos nucleicos inhibidores son ácidos nucleicos antisentido que consisten en la siguiente secuencia de nucleótidos, o su hebra perfectamente complementaria:

ATGAAACTCCTTGTGCTAG (SEQ ID NO: 3)

ACAGCGGCATCAGC (SEQ ID NO: 4)

TTCCGAAAATGATCAA (SEQ ID NO: 5)

CCCGGGGAGTGACCCC (SEQ ID NO: 6)

TACGGCTGCTACTGTGGCTT (SEQ ID NO: 7)

GACACATGACAACTGCTACGACC (SEQ ID NO: 8)

ACCCACACCTATTCATACTCGT (SEQ ID NO: 9)

ATCACCTGTAGCAGCA (SEQ ID NO: 10)

AGCTCCATATAACAAGGCA (SEQ ID NO: 11)

CAAGAAGTATTGTCAGAG (SEQ ID NO: 12)

Péptidos y fármacos pequeños

25 La invención también describe un péptido o un fármaco pequeño que inhibe la actividad de GIBsPLA2. El péptido o el fármaco pequeño generalmente es una molécula que se une selectivamente a GIBsPLA2, o a un sustrato de GIBsPLA2, o a un cofactor de GIBsPLA2, o a un producto de degradación o metabolito de la vía de GIBsPLA2.

30 Los péptidos preferiblemente contienen de 3 a 20 restos aminoácidos, y su secuencia puede ser idéntica a un dominio de GIBsPLA2 (péptido de cebo) o a un dominio de un sustrato de GIBsPLA2, cofactor, producto de degradación o metabolito. Los ejemplos de péptidos contienen de 4 a 30 restos aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO:2 (o de una correspondiente secuencia de un variante natural de SEQ ID NO:2). Los péptidos más concretos comprenden de 5 a 25 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO:2 (o de una correspondiente secuencia de un variante natural de SEQ ID NO:2), y comprenden además al menos uno de los siguientes restos aminoácidos de SEQ ID NO:2 (o de una correspondiente secuencia de un variante natural de SEQ ID NO:2): aminoácido 70,

aminoácido 121, aminoácido 50, aminoácido 52, aminoácido 54, aminoácido 71, o sus combinaciones. Los ejemplos específicos de péptidos son péptidos con menos de 25 aminoácidos que comprenden cualquiera de las siguientes secuencias:

NNYGCY (SEQ ID NO: 13)

CYCGLG (SEQ ID NO: 14)

YNNYGCYCGLGGSG (SEQ ID NO: 15)

FLEYNNYGCYCGLGGSGTPV (SEQ ID NO: 16)

QTHDN (SEQ ID NO: 17)

CQTHDNC (SEQ ID NO: 18)

ECEAFICNC (SEQ ID NO: 19)

DRNAAI (SEQ ID NO: 20)

DRNAAICFSKAPYNKAHKNL (SEQ ID NO: 21)

- 5 Los péptidos pueden comprender enlaces peptídicos, no peptídicos y/o peptídicos modificados. En una realización particular, los péptidos comprende al menos un enlace peptidomimético seleccionado de la intercalación de un grupo metileno (-CH₂-) o fosfato (-PO₂-), amina secundaria (-NH-) u oxígeno (-O-), alfa-azapéptidos, alfa-alquilpéptidos, N-alquilpéptidos, fosfonamidatos, depsiépéptidos, hidroximetilenos, hidroxietilenos, dihidroxietilenos, hidroxietilaminas, péptidos retro-inversos, metilenoxi, cetometileno, ésteres, fosfinatos, fosfínicos o fosfonamidas. Además, los
- 10 péptidos comprenden una función N-terminal y/o C-terminal protegida, por ejemplo, mediante acilación y/o amidación y/o esterificación.

Los péptidos pueden producirse mediante técnicas conocidas *per se* en la técnica, tales como síntesis química, biológica y/o genética.

Los fármacos pequeños preferidos son compuestos de hidrocarburos que se unen selectivamente a GIBsPLA2.

- 15 Los fármacos pequeños y los péptidos se obtienen preferiblemente mediante un método que comprende: (i) poner en contacto un compuesto de ensayo con GIBsPLA2, o uno de sus fragmentos, (ii) seleccionar un compuesto de ensayo que se une a GIBsPLA2, o a dicho uno de sus fragmentos, y (iii) seleccionar un compuesto de (ii) que inhibe una actividad de GIBsPLA2.

- 20 Los fármacos pequeños y los péptidos también pueden obtenerse mediante un método que comprende: (i) poner en contacto un compuesto de ensayo con un sustrato GIBsPLA2, cofactor o producto de degradación de GIBsPLA2, o uno de sus fragmentos, (ii) seleccionar un compuesto de ensayo que se une a dicho sustrato, cofactor o producto de degradación, o a uno de sus fragmentos, y (iii) seleccionar un compuesto de (ii) que inhibe una actividad de GIBsPLA2.

Receptores solubles de GIBsPLA2

- 25 En una realización alternativa, el inhibidor de GIBsPLA2 es una forma soluble de un receptor de GIBsPLA2. Dichos compuestos de receptores solubles son capaces de unirse a GIBsPLA2, inhibiendo con ello su actividad actuando como cebo o agente de enmascaramiento.

Una realización específica de dichos inhibidores es una forma soluble de un receptor de GIBsPLA2 humano o murino, o uno de sus fragmentos de unión a GIBsPLA2.

- 30 Las secuencias de aminoácidos de los receptores solubles murinos y humanos se muestran en SEQ ID NO:22 y 23, respectivamente. Por tanto, la expresión receptor soluble incluye cualquier polipéptido que se une a GIBsPLA2 que comprende la secuencia completa o un fragmento de SEQ ID NO:22 o 23.

5 Un fragmento de unión a GIBsPLA2 indica cualquier fragmento de dicho polipéptido que comprende preferiblemente al menos 5 aminoácidos consecutivos de este, más preferiblemente al menos 8, 10 o 12, que se une específicamente a PLA2GIB. La unión específica de la molécula de receptor indica que la molécula de receptor se une a PLA2GIB con una afinidad mayor (por ejemplo, en al menos 5 veces) que a PLA2-IIA o IID. Un fragmento, tal como se definió anteriormente, más preferiblemente comprende menos de 50 restos aminoácidos.

Los ejemplos de polipéptidos que se unen a GIBsPLA2 son, sin limitación, polipéptidos que comprenden al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKW (SEQ ID NO: 24)

WEKDLNSHICYQFNLLS (SEQ ID NO: 25)

DCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEK (SEQ ID NO: 26)

QYKVQVKS DNTVVARKQIHRWIAYTSSGGDICE (SEQ ID NO: 27)

LSYLNWSQEITPGPFVEHHC GTLEVVSA (SEQ ID NO: 28)

SRFEQAFITSLISSVAEKDSYFW (SEQ ID NO: 29)

WICRIPRDVRPKFPDWYQYDAPWLFYQNA (SEQ ID NO: 30)

AFHQAF LTVLLSRLGH THWIGLSTTDNGQT (SEQ ID NO: 31)

10 Las SEQ ID NO:24-26 se derivan de la secuencia del receptor de PLA2GIB soluble humano, mientras que las SEQ ID NO:27-31 se derivan del receptor de PLA2GIB soluble murino.

Vacunación

15 Tal como se describe en la solicitud, la inhibición de GIBsPLA2 en un sujeto puede obtenerse mediante la vacunación (o la inmunización) del sujeto con un antígeno de GIBsPLA2. Como resultado de dicha vacunación o inmunización, el sujeto produce anticuerpos (o células) que inhiben GIBsPLA2. En particular, una o más inyecciones de un antígeno de GIBsPLA2 (por ejemplo, una GIBsPLA2 inmunogénica fundamentalmente exenta de actividad biológica) pueden generar anticuerpos en el sujeto tratado. Estos anticuerpos protegerán frente a un exceso de expresión de GIBsPLA2, y pueden usarse como inmunoterapia o una profilaxis de vacuna.

En la solicitud también se describe un método de vacunar un sujeto que comprende administrar al sujeto un antígeno de GIBsPLA2.

20 En la solicitud también se describe un antígeno de GIBsPLA2 para su uso para vacunar a un sujeto que lo necesita.

25 En un ejemplo particular, el antígeno de GIBsPLA2 usado para la vacunación es una molécula inmunogénica inactivada que induce una respuesta inmunológica contra GIBsPLA2 en un sujeto. La inactivación puede obtenerse, por ejemplo, mediante la alteración química o física de GIBsPLA2 o mediante la mutación o el truncamiento de la proteína, o ambos; y la inmunogenicidad puede obtenerse como resultado de la inactivación y/o la posterior conjugación de la proteína con un vehículo o hapteno adecuado, tal como KLH, HSA, polilisina, una anatoxina vírica, o similares y/o mediante polimerización, o similares. Por tanto, el antígeno puede modificarse de forma química o física, por ejemplo, para mejorar su inmunogenicidad.

En una descripción preferida, el antígeno de GIBsPLA2 de la invención comprende GIBsPLA2, o uno de sus fragmentos o mimotopos que contienen epítopos.

30 En una descripción particular, el antígeno de GIBsPLA2 comprende una proteína de GIBsPLA2 de longitud completa. En otra realización particular, el antígeno de GIBsPLA2 comprende una proteína que comprende SEQ ID NO:2, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:2.

35 En una descripción alternativa, el antígeno de GIBsPLA2 comprende un fragmento de una proteína de GIBsPLA2 que comprende al menos 6 restos aminoácidos consecutivos y que contiene un epítopo inmunogénico, o uno de sus mimotopos. En una realización preferida, el antígeno de GIBsPLA2 comprende al menos de 6 a 20 restos

aminoácidos. Los ejemplos de péptidos contienen de 4 a 30 restos aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO:2 (o de una correspondiente secuencia de un variante natural de SEQ ID NO:2). Los péptidos más preferidos comprenden de 5 a 25 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO:2 (o de una correspondiente secuencia de un variante natural de SEQ ID NO:2), y comprenden además al menos uno de los siguientes restos aminoácidos de SEQ ID NO:2 (o de una correspondiente secuencia de un variante natural de SEQ ID NO:2): aminoácido 70, aminoácido 121, aminoácido 50, aminoácido 52, aminoácido 54, aminoácido 71, o sus combinaciones. Los ejemplos específicos de péptidos son péptidos con menos de 50 aminoácidos que comprenden cualquiera de las siguientes secuencias:

NNYGCY (SEQ ID NO: 13)
 CYCGLG (SEQ ID NO: 14)
 YNNYGCYCGLGGSG (SEQ ID NO: 15)
 FLEYNNYGCYCGLGGSGTPV (SEQ ID NO: 16)
 QTHDN (SEQ ID NO: 17)
 CQTHDNC (SEQ ID NO: 18)
 ECEAFICNC (SEQ ID NO: 19)
 DRNAAI (SEQ ID NO: 20)
 DRNAAICFSKAPYNKAHKNL (SEQ ID NO: 21)

El antígeno de GIBsPLA2 puede estar en diversas formas, tales como en forma libre o polimerizada, química o físicamente modificado y/o acoplado (es decir, conectado) con una molécula vehículo. El acoplamiento a un vehículo puede aumentar la inmunogenicidad y suprimir (aún más) la actividad biológica del polipéptido de GIBsPLA2. A este respecto, la molécula vehículo puede ser cualquier molécula vehículo o proteína que se emplea de modo convencional en inmunología, tal como, por ejemplo, KLH (hemocianina de lapa, "keyhole limpet hemocyanin"), ovoalbúmina, albúmina de suero bovina ("bovine serum albumin", BSA), una anatoxina vírica o bacteriana, tal como el toxoide del tétanos, el toxoide de la toxina B del cólera diftérico, sus mutantes, tales como la toxina de la difteria CRM 197, una proteína de vesícula de la membrana externa, una molécula de polilisina, o una partícula similar a un virus ("virus like particle", VLP). En una realización preferida, el vehículo KLH o CRM197 o una VLP.

El acoplamiento de GIBsPLA2 a un vehículo puede realizarse mediante la química covalente usando reacciones o grupos químicos de enlace, tales como, por ejemplo, glutaraldehído, biotina, etc. Preferiblemente, el conjugado o la proteína de GIBsPLA2 o fragmento o mimotopo se somete a un tratamiento con formaldehído para completar la inactivación de GIBsPLA2.

En una realización particular, el antígeno de GIBsPLA2 comprende una proteína de GIBsPLA2 de longitud completa, opcionalmente acoplada a una proteína vehículo. En una realización preferida, el antígeno de GIBsPLA2 comprende una proteína que comprende SEQ ID NO:2, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:2, acoplada a una proteína vehículo.

En otra realización particular, el antígeno de GIBsPLA2 comprende un péptido inmunogénico o mimotopo de GIBsPLA2, opcionalmente acoplado a una proteína vehículo. En una realización más preferida, el antígeno de GIBsPLA2 comprende un polipéptido con una longitud de al menos 10 aminoácidos, que comprende al menos uno de los siguientes restos aminoácidos de SEQ ID NO:2 (o de una correspondiente secuencia de un variante natural de SEQ ID NO:2): aminoácido 70, aminoácido 121, aminoácido 50, aminoácido 52, aminoácido 54, aminoácido 71, o sus combinaciones, opcionalmente acoplado a una molécula vehículo.

La inmunogenicidad del antígeno de GIBsPLA2 puede ensayarse mediante diversos métodos, tales como mediante la inmunización de un animal no humano injertado con células inmunológicas humanas, seguido de la verificación de la presencia de anticuerpos, o mediante un ELISA de sándwich usando anticuerpos humanos o humanizados. La falta de actividad biológica puede verificarse mediante cualquiera de los ensayos de actividad descritos en la solicitud. En una realización preferida, el antígeno de GIBsPLA2 tiene menos del 20%, más preferiblemente menos del 15%, 10%, 5% o incluso 1% de la actividad de una proteína de GIBsPLA2 de tipo salvaje en un método *in vitro* de (i) inducción de la formación de microdominios de membrana (MMD) en células T CD4, o (ii) hacer que las células T CD4 sean refractarias a la señalización de IL-2 o refractarias a la señalización de IL-7.

En una realización particular, la invención se refiere a una GIBsPLA2 inactivada e inmunogénica.

En otra realización particular, la invención se refiere a una proteína GIBsPLA2, o uno de sus fragmentos o mimotopo, conjugada con una molécula vehículo, preferiblemente con KLH.

En otro aspecto, la invención se refiere a una vacuna que comprende un antígeno de GIBsPLA2, un excipiente adecuado y, opcionalmente, un adyuvante adecuado.

Estas moléculas y conjugados y vacunas representan agentes potentes para su uso para inmunizar sujetos, provocando con ello una inhibición sostenida de GIBsPLA2. Tras su repetición, estos métodos pueden usarse para provocar una inhibición permanente de GIBsPLA2.

5 La invención también describe un método para inducir la producción de anticuerpos que neutralizan la actividad de GIBsPLA2 endógena en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno o vacuna de GIBsPLA2.

La administración de un antígeno o vacuna de la invención puede realizarse mediante cualquier vía adecuada, tal como mediante inyección, preferiblemente intramuscular, subcutánea, transdérmica, intravenosa o intraarterial; mediante administración nasal, oral, mucósica o rectal.

10 El antígeno o vacuna de GIBsPLA2 puede usarse para tratar cualquier enfermedad relacionada con una sobreproducción de GIBsPLA2. De modo más específico, esta invención se refiere a un método para tratar una enfermedad relacionada con una sobreproducción de GIBsPLA2 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno de GIBsPLA2 o de una composición de vacuna que comprende un antígeno de GIBsPLA2.

15 Agonistas o activadores de GIBsPLA2

El término "agonista" de GIBsPLA2, en el contexto de la presente invención, incluye cualquier sustancia que tiene actividad GIBsPLA2, o que media o sobrerregula esta actividad, tal como, sin limitación, un péptido, un polipéptido, una proteína recombinante, un conjugado, un ligando natural o artificial, un producto de degradación, un homólogo, un ácido nucleico, ADN, ARN, un aptámero, etc., o una de sus combinaciones. El término "agonista" incluye
20 agonistas totales y parciales. Un ejemplo particular de un agonista de GIBsPLA2 es una proteína de GIBsPLA2 o un ácido nucleico que codifica una proteína de GIBsPLA2.

En una realización particular, la invención se refiere a métodos para inhibir una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una proteína de GIBsPLA2 o un ácido nucleico que codifica una proteína de GIBsPLA2.

25 Composiciones

La invención también se refiere a composiciones que comprenden un antígeno o modulador de GIBsPLA2, tal como se describió en la presente, como ingrediente activo y, preferiblemente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una "composición farmacéutica" se refiere a una formulación de un compuesto de la invención (ingrediente activo) y un medio generalmente aceptado en la técnica para la administración de compuestos biológicamente activos al
30 sujeto que lo necesita. Este vehículo incluye todos los vehículos, diluyentes, medios o soportes para este farmacéuticamente aceptables. Puede emplearse la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas a los sujetos, por ejemplo, en forma de una dosificación unitaria.

Los compuestos o las composiciones según la invención pueden formularse en forma de un ungüento, gel, pasta, disoluciones líquidas, suspensiones, comprimidos, cápsulas de gelatina, cápsulas, supositorios, polvos, gotas
35 nasales o aerosoles, preferiblemente en forma de una suspensión o disolución inyectable. Para las inyecciones, los compuestos en general se envasan en forma de suspensiones líquidas, que pueden ser inyectadas por medio de jeringas o perfusiones, por ejemplo. A este respecto, los compuestos en general se disuelven en disolución salina, fisiológica, isotónica o tamponada, compatible con el uso farmacéutico y conocidas por los expertos en la técnica. Así, las composiciones pueden incluir uno o más agentes o excipientes seleccionados de dispersantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, etc. Los agentes o excipientes que pueden usarse en las formulaciones
40 líquidas y/o inyectables son, de modo notable, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, polisorbato 80, manitol, gelatina, lactosa, aceites vegetales, goma arábiga, etc. El vehículo también puede seleccionarse, por ejemplo, de metil-beta-ciclodextrina, un polímero del ácido acrílico (tal como carbopol), una mezcla de polietilenglicol y polipropilenglicol, monoetanolamina e hidroximetilcelulosa.

45 Las composiciones comprenden, en general, una cantidad eficaz de un compuesto de la invención, por ejemplo, una cantidad que es eficaz para modular la GIBsPLA2. En general, las composiciones según la invención comprenden de aproximadamente 1 µg a 1000 mg de un modulador de GIBsPLA2, tal como de 0,001-0,01, 0,01-0,1, 0,05-100, 0,05-10, 0,05-5, 0,05-1, 0,1-100, 0,1-1,0, 0,1-5, 1,0-10, 5-10, 10-20, 20-50, y 50-100 mg, por ejemplo, entre 0,05 y 100 mg, preferiblemente entre 0,05 y 5 mg, por ejemplo, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4 o 5 mg. La dosificación
50 puede ser ajustada por los expertos en la técnica dependiendo del modulador y de la enfermedad.

Las composiciones de la invención pueden comprender además uno o más compuestos activos adicionales, para un uso simultáneo o secuencial.

La invención también describe un método para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar un modulador de GIBsPLA2, tal como se describió previamente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, y
55 formular la composición en cualquier forma o recipiente adecuado (jeringa, ampolla, matraz, botella, bolsa, etc.).

La invención también describe un kit que comprende (i) una composición que comprende un modulador de GIBsPLA2, tal como se describió previamente, (ii) al menos un recipiente y, opcionalmente, (iii) instrucciones escritas para usar el kit.

Enfermedades

- 5 Los compuestos y las composiciones de la invención pueden usarse para tratar cualquier enfermedad relacionada con una respuesta inmunológica inapropiada (por ejemplo, defectuosa o incorrecta), en particular con una actividad de células T CD4 inapropiada, así como cualquier enfermedad en la que un aumento en la inmunidad puede mejorar la condición del sujeto. Estas enfermedades a veces se denominan "trastornos inmunológicos" en la presente solicitud. Estas incluyen situaciones inmunodefectuosas (por ejemplo, provocadas por una infección vírica, una
- 10 infección patogénica, un cáncer, etc.), enfermedades autoinmunitarias, injertos, diabetes, enfermedades inflamatorias, cánceres, alergias, asma, psoriasis, urticaria, eccema y similares.

Inmunodeficiencias y trastornos asociados

En un primer aspecto, la invención se basa en la inhibición de GIBsPLA2 en un sujeto, aumentando o restableciendo con ello una actividad inmunológica, en particular una actividad mediada por células T CD4.

- 15 Por tanto, en una realización particular, la invención se dirige a métodos para estimular una respuesta inmunológica en un sujeto que lo necesita, que comprenden inhibir la GIBsPLA2 en dicho sujeto.

En una realización particular, la invención se dirige a métodos para modular los leucocitos en un sujeto que lo necesita, que comprenden inhibir la GIBsPLA2 en dicho sujeto.

- 20 Los ejemplos de enfermedades que pueden beneficiarse de los inhibidores de GIBsPLA2 son todas enfermedades con una inmunodeficiencia, tal como una inmunodeficiencia mediada por VIH. A este respecto, en una realización particular, la invención se dirige a métodos para tratar una inmunodeficiencia o un trastorno asociado en un sujeto que lo necesita, que comprenden inhibir la GIBsPLA2 en dicho sujeto.

En otra realización particular, la invención se dirige a un inhibidor de GIBsPLA2 para su uso para tratar una inmunodeficiencia o un trastorno asociado en un sujeto que lo necesita.

- 25 Las inmunodeficiencias y los trastornos asociados indican cualquier afección o patología caracterizada y/o provocada por una función o respuesta inmunológica reducida en un sujeto. Las inmunodeficiencias pueden ser provocadas, por ejemplo, por una infección vírica (por ejemplo, VIH, hepatitis B, etc.), una infección bacteriana, cáncer u otras afecciones patológicas. Por tanto, la expresión "trastorno asociado a una inmunodeficiencia" indica cualquier enfermedad provocada o asociada con una inmunodeficiencia. La invención es particularmente adecuada
- 30 para tratar inmunodeficiencias relacionadas con células T CD4 y enfermedades asociadas. En efecto, la presente solicitud demuestra que los efectos biológicos de GIBsPLA2 están implicados en un estado de enfermedad de las células T CD4. Por consiguiente, el bloqueo de la actividad de GIBsPLA2 tiene un beneficio terapéutico en sujetos con una respuesta alterada a citoquinas que causa inmunodeficiencia, tal como se observa a menudo en pacientes infectados por VIH.

- 35 Por consiguiente, en una realización particular, la invención se refiere a métodos para tratar una infección por VIH en un sujeto mediante la inhibición de GIBsPLA2 en el sujeto, preferiblemente mediante la administración de un inhibidor o vacuna de GIBsPLA2 al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente de VIH temprano, y los métodos provocan un aumento en la probabilidad de que el paciente sea un controlador de VIH. En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente con baja inmunorreconstitución después de un tratamiento antirretrovírico y/o
- 40 con linfopenia de células T CD4 idiopática (ICL) grave. La invención también se refiere a un método para aumentar la actividad de células T CD4 en un sujeto infectado por VIH inhibiendo la GIBsPLA2 en el sujeto, preferiblemente administrando un inhibidor o vacuna de GIBsPLA2 al sujeto.

- 45 En otra realización, la invención se refiere a métodos para tratar la inflamación aguda y/o crónica y procesos derivados de reacciones inflamatorias en un sujeto, mediante la inyección de GIBsPLA2 al sujeto, directamente o asociada con fármacos antiinflamatorios.

- La invención también proporciona métodos para tratar el cáncer aumentando la respuesta inmunológica en el sujeto, que comprenden inhibir la GIBsPLA2 en el sujeto, preferiblemente mediante la administración de un inhibidor o vacuna de GIBsPLA2 al sujeto. La invención también proporciona métodos para tratar una inmunodeficiencia relacionada con células T CD4 asociada con un cáncer en un sujeto, mediante la inhibición de GIBsPLA2 en el
- 50 sujeto, preferiblemente mediante la administración de un inhibidor o vacuna de GIBsPLA2 al sujeto.

Respuestas inmunológicas patológicas y enfermedades asociadas

En la solicitud también se describe un método para tratar cualquier enfermedad relacionada con una respuesta inmunológica inapropiada (por ejemplo, defectuosa o incorrecta), o con una (hiper)actividad o (hiper)activación no deseada del sistema inmunológico, en particular con una actividad de células T CD4 inapropiada. Estas

enfermedades incluyen, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, injertos, diabetes, alergias, asma, psoriasis, urticaria, eccema y similares.

En una realizaci3n particular, la invenci3n describe m3todos para inhibir una respuesta inmunol3gica en un sujeto que lo necesita, que comprenden inducir o activar la GIBsPLA2 en dicho sujeto.

5 En una realizaci3n particular, la invenci3n describe m3todos para inhibir los leucocitos en un sujeto que lo necesita, que comprenden inhibir la GIBsPLA2 en dicho sujeto.

10 En otra realizaci3n particular, la invenci3n describe m3todos para tratar un trastorno provocado por una respuesta inmunol3gica no deseada en un sujeto que lo necesita, que comprenden inducir o activar la GIBsPLA2 en dicho sujeto.

La inducci3n o la activaci3n de GIBsPLA2 en un sujeto preferiblemente comprende administrar al sujeto un agonista de GIBsPLA2, por ejemplo, una prote3na de GIBsPLA2, o uno de sus fragmentos funcionales.

En otra realizaci3n particular, la invenci3n describe un agonista o un activador de GIBsPLA2 para su uso para tratar un trastorno provocado por una respuesta inmunol3gica no deseada en un sujeto que lo necesita.

15 Los ejemplos de enfermedades que pueden beneficiarse de los agonistas de GIBsPLA2 son trastornos autoinmunitarios, c3nceres, enfermedades v3ricas, infecciones bacterianas, etc.

En una realizaci3n particular, la invenci3n describe m3todos para tratar un trastorno autoinmunitario en un sujeto que lo necesita, que comprenden estimular o inducir la GIBsPLA2 en dicho sujeto.

20 En otra realizaci3n particular, la invenci3n describe un compuesto o una composici3n de la invenci3n para su uso para tratar un trastorno autoinmunitario en un sujeto que lo necesita.

En una realizaci3n particular, la invenci3n describe m3todos para tratar un c3ncer en un sujeto que lo necesita, que comprenden estimular o inducir la GIBsPLA2 en dicho sujeto.

En otra realizaci3n particular, la invenci3n describe un compuesto o una composici3n de la invenci3n para su uso para tratar un c3ncer en un sujeto que lo necesita.

25 La invenci3n tambi3n describe un m3todo para tratar (por ejemplo, reducir o prevenir o inhibir) el rechazo a injertos o para tratar la enfermedad del injerto frente al receptor en un sujeto trasplantado, que comprende estimular o inducir la GIBsPLA2 en dicho sujeto. La invenci3n tambi3n describe un m3todo para mejorar la tolerancia a injertos alogeneicos en un sujeto, que comprende estimular o inducir la GIBsPLA2 en dicho sujeto.

Actividad antimicrobiana

30 La presente solicitud tambi3n describe un m3todo para matar microbios usando GIBsPLA2. Actuando directamente sobre las membranas, la GIBsPLA2 puede destruir o matar bacterias, virus con envuelta, par3sitos y similares.

35 En infecciones o en infecciones agudas, la GIBsPLA2 puede usarse por s3 sola o asociada con antibi3ticos, f3rmacos antiv3ricos, antirretrov3ricos y antiparasitarios. En el caso de los microbios resistentes a f3rmacos antimicrobianos conocidos, la GIBsPLA2 puede representar una terapia alternativa. Puede usarse en un tratamiento a muy corto plazo, por ejemplo, en situaciones cl3nicas agudas y muy peligrosas.

40 Los ejemplos espec3ficos de enfermedades que pueden beneficiarse del tratamiento con GIBsPLA2 seg3n la invenci3n son todas las situaciones cl3nicas con una hiperactividad del sistema inmunol3gico o una inflamaci3n cr3nica, tales como esclerosis m3ltiple, miastenia grave, neuropat3as autoinmunitarias, tales como s3ndrome de Guillain-Barr3, uveitis autoinmunitaria, uveitis, anemia hemol3tica autoinmunitaria, anemia perniciosa, trombocitopenia autoinmunitaria, arteritis temporal, s3ndrome antifosfol3pidos, vasculitis, tales como granulomatosis de Wegener, enfermedad de Behcet, aterosclerosis, psoriasis, dermatitis herpetiforme, p3nfigo vulgar, vit3ligo, p3nfigo vulgar, micosis fungoide, dermatitis por contacto al3rgica, dermatitis at3pica, liquen plano, PLEVA, eccema, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmunitaria, diabetes mellitus de tipo 1, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, tiroiditis autoinmunitaria, artritis reumatoide, lupus eritematoso sist3mico, escleroderma, polimiositis, dermatomiositis, espondiloartropat3as, tales como espondilitis anquilosante, o s3ndrome de Sjogren.

La duraci3n, las dosificaciones y la frecuencia de administraci3n de los compuestos o las composiciones de la invenci3n puede adaptarse seg3n el sujeto y la enfermedad. El tratamiento puede usarse por s3 solo o en combinaci3n con otros ingredientes activos, de modo simult3neo o secuencial o por separado.

50 Los compuestos o las composiciones seg3n la invenci3n pueden administrarse en diversas formas o v3as, tales como, sin limitaci3n, mediante inyecci3n sist3mica, por v3a intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, cut3nea,

subcutánea, dérmica, transdérmica, intratecal, ocular (por ejemplo, corneal) o rectal, o mediante administración típica en un sitio de inflamación, y preferiblemente mediante inyección intramuscular o intravenosa.

Un régimen típico comprende una única administración o administraciones repetidas de una cantidad eficaz de un modulador de GIBsPLA2 a lo largo de un periodo de uno a varios días, hasta un año, e incluye entre una semana y aproximadamente seis meses. Se entiende que la dosificación de un compuesto o una composición farmacéutica de la invención administrados *in vivo* dependerá de la edad, la salud, el sexo y el peso del receptor (sujeto), el tipo de tratamiento concurrente, si existe, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto farmacéutico deseado. Los intervalos de dosis eficaces proporcionados en la presente no pretenden ser limitantes y representan intervalos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosificación más preferida se adaptará al sujeto individual, tal como entienden y pueden determinar los expertos en la técnica pertinente (véase, por ejemplo, Berkowet *et al.*, eds., The Merck Manual, 16ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Goodmanetna., eds., Goodman and Cilman's, The pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, NY, (2001)).

Diagnosis

La invención también describe métodos para detectar un defecto inmunológico en un sujeto basándose en la detección de la presencia o la cantidad o la ausencia de GIBsPLA2 en una muestra procedente de un sujeto. El método puede realizarse usando una diversidad de tecnologías o plataformas de detección conocidas *per se* en la técnica, tales como, sin limitación, ensayo de captura, ensayo de sándwich, ensayo de competición, radioinmunoensayos, marcadores enzimáticos con sustratos que generan productos coloreados, fluorescentes, quimioluminiscentes o electroquímicamente activos, fluorescencia, polarización fluorescente, quimioluminiscencia, óptica y colorimétrica, electroquimioluminiscencia, fluorescencia de resolución en el tiempo, resonancia de plasmón de superficie, ondas evanescentes, placas de múltiples pocillos (ELISA), ensayo individual, ensayo de múltiplex, ensayo de múltiplex con esferas de látex, micromatrices (superficie laminar)-ensayo de múltiplex, ensayos basados en placas de vidrio o ensayos basados en tiras.

En una realización particular, el método comprende determinar la presencia o la cantidad o la ausencia de un polimorfismo en el gen, ARN o proteína de GIBsPLA2. Los resultados de los inventores demuestran que la GIBsPLA2 está sujeta a un elevado polimorfismo y que esto se correlaciona con el estado fisiológico de los sujetos. Por tanto, la invención comprende (i) determinar la presencia o la cantidad o la ausencia de una isoforma polimórfica concreta de GIBsPLA2 y/o (ii) determinar la tasa global de polimorfismo de la GIBsPLA2 en un sujeto, correlacionándose dichos datos con el estado fisiológico del sujeto. En particular, las isoformas específicas pueden ser características de la predisposición, la presencia o la aparición en un sujeto de un trastorno, tal como se describió anteriormente. Esta determinación también puede usarse en la medicina personalizada para ajustar el tratamiento.

Métodos para controlar y/o diagnosticar una inmunodeficiencia asociada con defectos en las células T CD4 que comprenden detectar la GIBsPLA2

También se describen métodos para controlar y/o diagnosticar una inmunodeficiencia asociada con defectos en las células T CD4, en particular, en una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en un sujeto. En algunas realizaciones, los métodos comprenden (a) proporcionar una muestra que contiene un fluido corporal, preferiblemente plasma procedente de un sujeto, y (b) detectar un nivel de GIBsPLA2 en la muestra por encima de un umbral. La presencia de GIBsPLA2 en la muestra puede detectarse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante un método que comprende un ensayo enzimático, un ensayo de ligandos de captura y/o un inmunoensayo.

En algunas realizaciones, el método comprende obtener una muestra que comprende plasma procedente de un sujeto y determinar si el plasma tiene al menos una actividad seleccionada de inducir la formación de microdominios de membrana (MMD) anómalos en células T CD4 procedentes de sujetos sanos, y hacer que las células T CD4 de sujetos sanos sean refractarias a la señalización de interleuquina-7 (IL-7). Si el plasma procedente del sujeto comprende esta actividad, entonces se determina que el sujeto, en algunas realizaciones, tiene una inmunodeficiencia relacionada con células T CD4, tal como se observa a menudo en paciente infectados por VIH, pero no solo en estos. Si la fracción de plasma no comprende esta actividad, entonces se determina que el sujeto, en algunas realizaciones, tiene una baja exposición a una inmunodeficiencia relacionada con la alteración de células T CD4 frente a la homeostasis regulada por citoquinas.

En algunas realizaciones, se determina que el sujeto tiene una infección por VIH. Por contraste, si la fracción de proteínas no comprende esta actividad, entonces se determina que el sujeto, en algunas realizaciones, no tiene una inmunodeficiencia relacionada con defectos en las células T CD4, tal como se describe en la presente. En algunas realizaciones, se determina que el sujeto no tiene una infección por VIH.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto la muestra que comprende un fluido corporal, preferiblemente plasma, procedente del sujeto con un anticuerpo específico de GIBsPLA2, y determinar la presencia o la ausencia de una reacción inmunológica. En algunas realizaciones, la presencia o la ausencia de una reacción inmunológica se determina mediante un método que comprende un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

(ELISA). La presencia de una reacción inmunológica entre el anticuerpo específico de GIBsPLA2 y la muestra indica la presencia de GIBsPLA2 en la muestra, lo cual, a su vez, indica que el sujeto tiene una inmunodeficiencia asociada con defectos en las células T CD4. En algunas realizaciones, se determina que el sujeto tiene una infección por VIH. Por contraste, la ausencia de una reacción inmunológica entre el anticuerpo específico de GIBsPLA2 y la muestra indica que el sujeto no tiene una inmunodeficiencia asociada con defectos en las células T CD4, tal como se describe en la presente. En algunas realizaciones, se determina que el sujeto no tiene una infección por VIH.

En algunas realizaciones, el ensayo para la presencia de GIBsPLA2 en la muestra es cualitativo. En algunas realizaciones, el ensayo para la presencia de GIBsPLA2 en la muestra es cuantitativo.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden comparar los resultados del ensayo con los resultados de un ensayo similar de una muestra control que comprende plasma procedente de un sujeto que no tiene una inmunodeficiencia asociada con defectos en las células T CD4. En algunas realizaciones, los métodos comprenden comparar los resultados del ensayo con los resultados de un ensayo similar de una muestra que comprende plasma del mismo sujeto recolectada antes.

Métodos para controlar y/o diagnosticar una inmunodeficiencia asociada con la alteración de células T CD4 que comprenden caracterizar los microdominios de membrana sobre las células T CD4

Los datos en los ejemplos demuestran que los pacientes infectados por VIH presentan la formación de microdominios de membrana (MMD) distintivos sobre la superficie de células T CD4, aunque muy pocas células están realmente infectadas por VIH. Por consiguiente, esta descripción también proporciona métodos para diagnosticar una inmunodeficiencia asociada con una alteración en las células T CD4, tal como, por ejemplo, una inmunodeficiencia provocada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en un sujeto. En algunas realizaciones, los métodos comprenden: (a) aislar linfocitos T CD4 de un sujeto, y (b) medir el número y/o el tamaño de los microdominios de membrana (MMD) sobre las células T. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además al menos uno de (c) medir la cantidad de fosfo-STAT5 en las células T, y (d) ensayar la fracción de importación nuclear de fosfo-STAT5 en las células T. En algunas realizaciones, se mide el número y/o el tamaño de los MMD sobre las células T en ausencia de interleuquinas. En algunas realizaciones, se mide el número y/o el tamaño de los MMD sobre las células T en ausencia de IL-2. En algunas realizaciones, se mide el número y/o el tamaño de los MMD sobre las células T en ausencia de IL-7. En algunas realizaciones, se mide el número y/o el tamaño de los MMD sobre las células T en presencia de un nivel subumbral de interleuquinas.

En algunas realizaciones, si el número de MMD sobre las células T aisladas del sujeto es al menos un umbral, esto indica que el sujeto tiene una inmunodeficiencia asociada con la alteración de células T CD4. En algunas realizaciones, esto indica que el sujeto tiene una infección por VIH. En algunas realizaciones, si el número de MMD sobre las células T aisladas del sujeto no es al menos un umbral, esto indica que el sujeto no tiene una inmunodeficiencia asociada con la alteración de células T CD4, tal como se describe en la presente. En algunas realizaciones, esto significa que el sujeto no tiene una respuesta de células T CD4 alterada frente a la señalización de citoquinas. En algunas realizaciones, esto significa que el sujeto no tiene una respuesta de células T CD4 alterada frente a la interleuquina-7. En algunas realizaciones, esto indica que el sujeto no tiene una infección por VIH. En algunas realizaciones, el umbral es al menos aproximadamente 80 por célula, al menos aproximadamente 90 por célula, al menos aproximadamente 100 por célula, al menos aproximadamente 110 por célula, o al menos aproximadamente 120 por célula. En una realización preferida no limitante, el umbral es de aproximadamente 100 por célula. En algunas realizaciones, si los MMD sobre las células T aisladas del sujeto tienen un diámetro de al menos un umbral, esto indica que el sujeto tiene una infección por VIH. En algunas realizaciones, si los MMD sobre las células T aisladas del sujeto no tienen un diámetro de al menos un umbral, esto indica que el sujeto no presenta una respuesta alterada a la interleuquina-7 y, más en general, a citoquinas. En algunas realizaciones, esto indica que el sujeto no tiene una infección por VIH. En algunas realizaciones, el umbral es un diámetro de al menos 100 nm, al menos 110 nm, al menos 120 nm, al menos 130 nm, o al menos 140 nm. En una realización preferida no limitante, el umbral es un diámetro de al menos aproximadamente 120 nm.

Debido a que RIF puede alterar la capacidad de respuesta de las células T CD4 a la IL-7 agregando los receptores de membrana en MMD anormalmente grandes, también pueden verse afectadas las respuestas a otras citoquinas y gamma-c, y RIF también podría asociarse con otras patologías que implican una respuesta de células T CD4 alterada.

Métodos para identificar candidatos a agentes terapéuticos

Esta invención también describe métodos para identificar un candidato a agente terapéutico, que comprenden: (a) poner en contacto linfocitos T CD4 con GIBsPLA2 en presencia de un agente, y (b) medir la activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2. En algunas realizaciones, los métodos comprenden (c) comparar el nivel de activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 en presencia del agente con el nivel de activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 en ausencia del agente. En algunas realizaciones, si el nivel de activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 en presencia del agente es menor que el nivel de activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 en ausencia del agente, entonces el agente se identifica como candidato a agente terapéutico para la inmunodeficiencia. En algunas realizaciones, el agente se identifica como un candidato a agente terapéutico para el

VIH. En algunas realizaciones, si el nivel de activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 en presencia del agente es mayor que el nivel de activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 en ausencia del agente, entonces el agente se identifica como candidato a agente terapéutico inmunosupresor.

5 En algunas realizaciones, la medición de la activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 comprende determinar el número de MMD por célula T CD4.

En algunas realizaciones, la medición de la activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 comprende determinar el diámetro promedio de MMD en células T CD4.

10 En algunas realizaciones, la medición de la activación de células T CD4 inducida por GIBsPLA2 comprende determinar la capacidad de respuesta a IL-7 de células T CD4 ensayada mediante fosforilación de STAT5 y/o importación nuclear.

15 Tal como se emplea en la presente, un "agente" puede ser cualquier entidad química en evaluación como producto terapéutico potencial. En algunas realizaciones, el agente es una molécula orgánica. En algunas realizaciones, el agente comprende de 2 a 100 átomos de carbono, tal como de 2 a 50 átomos de carbono, de 5 a 50 átomos de carbono, o de 10 a 50 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el agente es un péptido, una proteína, una glicoproteína o una lipoproteína. En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo.

20 En algunas realizaciones, no se ha determinado previamente que el agente tenga una actividad biológica que implique una utilidad como agente terapéutico para el tratamiento de la inmunodeficiencia, tal como la que se asocia a menudo con una infección por VIH. En algunas realizaciones, se ha determinado previamente que el agente tiene una actividad biológica que implica una utilidad como agente terapéutico para el tratamiento de la inmunodeficiencia, tal como la que se asocia a menudo con una infección por VIH.

25 Tal como se emplea en la presente, un "candidato a agente terapéutico para la inmunodeficiencia" o un "candidato a agente terapéutico para el VIH" es un agente que inhibe la capacidad de RIF para activar a las células T CD4 en al menos un ensayo. En coherencia con los datos indicados en la presente, la capacidad de un agente para inhibir la capacidad de GIBsPLA2 para activar células T CD4 en al menos un ensayo es una manera útil para identificar agentes que es probable que sean terapéuticamente útiles para tratar inmunodeficiencias que incluyen inmunodeficiencias asociadas con infecciones por VIH. Por consiguiente, también es una manera útil para identificar agentes que es probable que sean terapéuticamente útiles para tratar una infección por VIH. Por supuesto, como con todas las moléculas terapéuticas, será necesaria una caracterización posterior. Sin embargo, esto no disminuye la utilidad de los candidatos a agentes terapéuticos para el VIH de esta descripción.

30 En la siguiente sección experimental, que se considerará ilustrativa, se describen otros aspectos y ventajas de la invención.

Ejemplos

1. Materiales y métodos

1.1. Pacientes

35 Los VP incluidos en el estudio habían sido positivos a VIH durante más de un año. Nunca habían recibido ningún fármaco antirretrovírico y tenían una carga vírica > 10.000 copias de ARN/ml con un recuento de CD4 > 200/μl en el momento de la recogida de sangre (estudios ANRS EP 33 y EP20). Todas las muestras de sangre procedentes de los VP se extrajeron en Centre Hospitalier de Gonesse. La sangre procedente de los HD fue suministrada por Etablissement Français du Sang (Centre Necker-Cabanel, París). Las muestras de plasma procedentes de pacientes ART se extrajeron de individuos que habían estado recibiendo tratamiento durante al menos un año. Su carga vírica había permanecido indetectable durante al menos 6 meses, y sus recuentos de CD4 > 500/μl en el momento de la recogida de sangre. Las muestras de plasma procedentes de pacientes HIC se extrajeron de individuos con una carga vírica indetectable durante 10 años después de la infección. Las muestras de plasma se recogieron en Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur.

45 1.2. Análisis de los microdominios de membrana (MMD), tasas de difusión de receptores y compartimentalización celular de fosfo-STAT5 en linfocitos T CD4 purificados

50 Se purificaron células T CD4 mediante selección negativa como se ha descrito previamente (10) y después se activaron con IL-7 humana glicosilada recombinante 2 nM (Cytheris) o 40 μg de PHA (Sigma). La microscopía confocal y de STED usadas para estudiar los microdominios (MMD) de la superficie celular y la distribución en compartimentos celulares de fosfo-STAT5 ya han sido descritas (10, 12). También se ha descrito el análisis por FCS de la difusión de proteínas en la superficie de células vivas (10, 12).

1.3. Preparación y análisis de microdominios resistentes a detergentes (DRM)

La preparación de lisados con Triton-X100 de linfocitos T CD4 procedentes de HD o VP, seguida de una

centrifugación a través de gradientes de sacarosa y análisis de la transferencia Western de las fracciones recogidas se ha descrito previamente (12). Se usaron mAb específicos de flotilina, IL-7Ralfa y gamma c para detectar las correspondientes bandas mediante transferencias Western (12).

1.4. Caracterización de RIF a partir de plasma de VP

5 1.4.1. Bioensayos

El ensayo de inducción de MMD fue como sigue: el plasma de VP (al 5 o 10%) primero se incubó (20 min) en medio con células T CD4 de HD purificadas. Después las células se cultivaron en portaobjetos de vidrio revestidos con polilisina durante 10 min, después se activaron mediante 15 min con IL-7 (2 nM) o sin IL-7 para el control (NS), después se fijaron mediante PFA (PFA, al 1,5%, 15 min a 37 °C, seguidos de 15 min a temperatura ambiente) equilibrándose durante una hora en PBS/SVF al 5% antes de teñirse con la toxina B del cólera (CtxB-AF488). Los MMD se contaron mediante microscopía de STED.

15 Los ensayos para la inhibición de la fosforilación de STAT y la translocación nuclear fueron como sigue: el plasma de VP (al 5 o 10%) primero se incubó con células T CD4 de HD purificadas (20 min) antes de una estimulación con IL-7 (2 nM, 15 min). Después las células se cultivaron en portaobjetos de vidrio revestidos con polilisina durante 10 min, después se activaron mediante 15 min con IL-7 (2 nM) o sin IL-7 para el control (NS), después se fijaron mediante PFA (PFA, al 1,5%, 15 min a 37 °C, seguidos de 15 min a temperatura ambiente) y se permeabilizaron con metanol (al 90% a -20 °C). Las células se equilibraron durante una hora en PBS/SVF al 5%, después el fosfo-STAT5 se tiñó con anti-STAT5 de conejo marcado con anti-Atto642 de conejo de cabra y se analizaron mediante FACS o microscopía de STED.

20 1.4.2. Tratamientos con enzimas

Se evaluaron los efectos de una digestión con enzimas sobre la actividad RIF tratando plasma de VP filtrado con una membrana de 30 kDa. Se usaron los compuestos del plasma con PM < 10 kDa como controles negativos. Se ensayaron los efectos de la tripsina porcina (1 U/ml durante 30 min a 37 °C, seguido de una inhibición de PMSF e intercambio del tampón con filtros de centrífuga de membrana de 5 kDa de Millipore), o ADNasa I (1 U/ml durante 30 min a 37 °C), o ARNasa (1 U/ml durante 30 min a 37 °C) o péptido N-glicanasa (1 U/ml durante 30 min a 37 °C). Todas las preparaciones se analizaron a una concentración final del 10%.

1.4.3. Determinación del PM o purificación de RIF

30 Se realizó una cromatografía de exclusión molecular cargando 1,6 ml de plasma en una columna de 85 ml Sephadex G100 preequilibrada con carbonato de amonio (0,1 M) o PBS, y después recogiendo fracciones de 0,8 ml del eluato. La columna se calibró usando un conjunto de proteínas (GE-Healthcare). La concentración de proteínas se midió mediante el método de Bradford. Se ensayó el plasma de VP filtrado con una membrana de 100 kDa y el plasma de VP total, y ambos produjeron idénticos resultados. Se recogieron las fracciones entre 13-17 kDa, que contienen RIF semipurificado.

1.4.4 Determinación del punto isoelectrico

35 Se realizó una cromatografía de intercambio aniónico o catiónico en columnas de 1 ml MonoQ o MonoS (GE-Healthcare) con elución mediante sucesivas etapas de pH (tampones carbonato de amonio/acetato de amonio). Se midió el pH de cada fracción eluida y estas después se ajustaron a pH 7,4 antes de ensayar sus efectos biológicos. Se midió la actividad RIF en las correspondientes fracciones inmediatamente después de la elución.

1.4.5 Análisis de MS

40 Se liofilizaron muestras procedentes de la filtración en gel (G100), después se resuspendieron, se reunieron y se proteolizaron con tripsina porcina, según métodos conocidos *per se* en la técnica. Después se separaron los péptidos proteolíticos en 12 fracciones mediante una cromatografía a través de una columna C18 eluida en acetato de amonio. Las 12 fracciones se separaron a través de C18 eluida en fase inversa (acetonitrilo) y directamente se inyectaron mediante electropulverización en un orbitrap Velos (Thermo Scientific) para el análisis de MS con fragmentación de Ar secundaria y después MS/MS para los 10 picos de mayor intensidad por barrido de MS.

Se usaron los programas informáticos Mascot y X-Tandem convencionales. Para cada proteína de los subconjuntos de la base de datos, se calcularon 3 criterios:

50 - Puntuación de i: Cálculo de la especificidad teórica de cada péptido procedente de la digestión con tripsina de una única proteína en la base de datos NextProt enriquecida con proteínas maduras con ruptura del péptido señal (número de péptidos exclusivos/proteína): número de péptidos específicos en todas las secuencias humanas (todas), secuencias con un péptido señal N-terminal (sec) por proteína.

- Cálculo de la aparición teórica de péptidos compatibles con picos procedentes de toda la serie de barridos de MS (picos que se corresponden con péptidos teóricos/proteína).

- Cálculo de la cobertura teórica de la secuencia de la proteína con los péptidos que se corresponden con picos.

Para cada proteína se determinó una puntuación p , como un cálculo de las tres puntuaciones.

Ejemplo 1: Activación aberrante de linfocitos T CD4 procedentes de VP medida mediante la presencia de microdominios de membrana (MMD) anómalos

5 Este ejemplo describe la investigación de nuevos parámetros moleculares y celulares que explican algunas de las respuestas anómalas observadas en los linfocitos T CD4 en pacientes infectados crónicamente por VIH. La activación crónica del sistema inmunológico habitualmente se mide evaluando la sobreexpresión de moléculas de la superficie celular, tales como CD38, HLA-DR y CD25, que se consideran como los marcadores principales de la disfunción de CD4 (15). Sin embargo, a pesar de muchos esfuerzos, estos datos siguen sin estar claros, y el fenotipo de las células T CD4 no puede explicar directamente sus defectos inmunológicos.

10 Se usó la microscopía de STED y el marcaje con la toxina B del cólera (CtxB-AF488) para detectar la presencia de MMD (12). Antes de cualquier estimulación, se descubrió que la superficie de los linfocitos T CD4 purificados a partir de VP porta muchos más MMD que los linfocitos T CD4 quiescentes purificados a partir de HD (figura 1a). Además, y de lo modo más importante, todas las células T CD4 procedentes de VP mostraron un número mayor de MMD. Este patrón anómalo no es consecuencia de la estimulación con IL-7 en plasma de VP, puesto que el promedio de concentración de IL-7 en este plasma (0,4 pM) es solo la 100 parte de la Kd de la IL-7R (13, 14). Cuando las células T CD4 purificadas procedentes de HD se estimularon con IL-7, se observó un gran número de MMD. Por contraste, el patrón de MMD de las células T CD4 procedentes de VP no se vio afectado por IL-7 (figura 1a). Esta activación anómala, acoplada con la ausencia de cualquier respuesta a IL-7, puede ser imitada por un estímulo no fisiológico, tal como con fitohemaglutinina (PHA) (figura 1a).

15 Después se cuentan estos diversos MMD anómalos. Se observaron aproximadamente 150-200 MMD por célula T CD4 procedentes de VP, así como en células T CD4 de HD estimuladas con PHA (figura 1c). De nuevo, en este caso, los resultados obtenidos demuestran que todas las células T CD4 procedentes de VP expresan MMD, incluyendo todas las subpoblaciones principales de CD4 (figura 1c). La IL-7 no aumentó el número de MMD en VP. Por contraste, el número de MMD en células T CD4 de HD aumentó desde un nivel de fondo hasta aproximadamente 10 MMD/célula hasta 300 después de una estimulación con IL-7. También se realizó un estudio del tamaño de los MMD (figuras 1d y e). Este demostró que los MMD sobre las células T CD4 procedentes de VP y sobre las células T CD4 de HD estimuladas con PHA eran mucho mayores (250 nm) que los procedentes de células T CD4 de HD estimuladas con IL-7 (90 nm).

20 Ejemplo 2: Todas las cadenas IL-7R alfa y gamma-c son secuestradas en los microdominios de membrana resistentes a detergentes (DRM) anómalos aislados a partir de células T CD4 de VP

25 Se analizaron células T CD4 de HD en reposo para verificar que las cadenas IL-7R alfa y gamma-c estaban localizadas en fracciones de alta densidad fuera de los MMD. Cuando estas células T CD4 de HD son estimuladas por IL-7, estas dos cadenas se localizan en fracciones de baja densidad, que se corresponden con MMD resistentes a detergentes o DRM que contienen todas las proteínas secuestradas en MMD (figura 2).

30 Cuando se repitió el estudio con células T CD4 purificadas a partir de VP, el patrón fue diferente (figura 2). Antes de cualquier estimulación, todas las cadenas IL-7R alfa y gamma-c ya se encontraban secuestradas en los DRM; ninguna estaba localizada en las fracciones de alta densidad que se corresponden con los receptores libres fuera de los MMD. Además, una preestimulación de las células T CD4 con IL-7, antes de la preparación de los DRM, no afectó a este patrón (los datos no se muestran). De nuevo, en este caso, la preestimulación de las células T CD4 de HD con PHA no fisiológico reproduce esta situación patológica. Esto confirma los datos en la figura 1 y demuestra que las células T CD4 en VP están sometidas a una activación aberrante antes de cualquier estimulación. Además, estos MMD anómalos contienen todas las cadenas IL-7R (figura 2).

35 Ejemplo 3: Análisis en gel bidimensional del señalosoma de IL-7 en células T CD4 purificadas procedentes de HD, VP y células de estimuladas con IL-7. Caracterización del estado de activación aberrante mediante el patrón de proteínas recuperadas después de una inmunoprecipitación

Se usó una electroforesis bidimensional para demostrar que la composición del señalosoma de IL-7 en VP es anómalo y diferente del que aparece en células T CD4 de HD activadas con IL-7 y quiescentes (figura 7a, 7b y 7c).

40 Se inmunoprecipitaron proteínas con anti-IL-7R alfa (mAb de ratón 40131, R&D System) inmovilizado sobre proteína G-Sepharose 4G a partir de un lisado de células T CD4 purificadas, y se separaron en una 2D-PAGE (IEF en tiras de gel de pH 3-10, seguido por gel de SDS con bis-acrilamida al 12%). Se muestran las escalas de pH y PM (kDa). Los geles se tiñeron con Sypro-Ruby. Los geles mostrados son representativos de 8 parejas de NS/IL-7 obtenidas a partir de HD y 3 geles procedentes de VP.

Figura 7a: Células T CD4 de HD no estimuladas (NS).

55 Figura 7b: Células T CD4 de VP. Se observaron más manchas en geles bidimensionales teñidos con Sypro Ruby

preparados a partir de VP, que los preparados a partir de HD. Además, se observó que las manchas comunes eran más intensas cuando los geles bidimensionales se prepararon con extractos de VP.

5 Figura 7c: Células T CD4 de HD estimuladas con IL-7. El patrón en las células T CD4 de HD estimuladas con IL-7 difiere del de células T CD4 de VP. Esto apoya aún más la propuesta de que la activación aberrante que se encuentra en VP no es la consecuencia de una estimulación con IL-7 que pueda tener lugar en órganos con niveles elevados de IL-7, por ejemplo, en órganos productores de IL-7.

10 A partir de este análisis, puede concluirse que las cadenas de IL-7R en VP no solo son parte de los MMD anómalos, sino que también interactúan con complejos de proteínas diferentes de los que se encuentran en el señalosoma de IL-7 normal.

Ejemplo 4: Tasa de difusión de IL-7Ralfa en la superficie de células T CD4 purificadas procedentes de HD, VP y células HD estimuladas con PHA. La IL-7Ralfa en células T CD4 de VP se introduce en MMD anómalos ricos en lípidos, limitando con ello sus tasas de difusión y evitando cualquier interacción con el citoesqueleto y, por tanto, cualquier capacidad de transmitir señales.

15 La difusión bidimensional de IL-7Ralfa teñida con mAb AF488-anti-IL-7Ralfa se midió mediante FCS en la superficie de células T CD4 vivas. Los resultados se muestran en la figura 8. Se midieron los tiempos de difusión τ_D (en 10^{-3} seg) en ausencia de IL-7 (\circ , autocorrelación) o en presencia de IL-7-biotina-SAF633 (\bullet , correlación cruzada) como se ha descrito (10, 12). Estos momentos después se representaron gráficamente frente a la superficie específica celular ω_0^2 (en 10^3 nm^2) interceptada por el volumen confocal. Se muestran las gráficas de difusión con y sin pretratamiento con inhibidores de MMD (COasa 1 $\mu\text{g/ml}$ más SMasa 0,1 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 min) o inhibidores del citoesqueleto (CitD 20 μM más Col 10 μM durante 30 min).

20

Las barras indican PEE para 5 experimentos independientes. Las pendientes de la regresión lineal produjeron unas tasas de difusión eficaz D_{eff} y un tiempo de confinamiento extrapolado por intersección con y τ_0 como describieron previamente los inventores (12). Se muestran las D_{eff} en la gráfica de barras de la figura 3a.

25 Figuras 8a, 8d: En la superficie de células T CD4 de HD.

Figuras 8b, 8e: En la superficie de células T CD4 de VP.

Figuras 8c, 8f: En la superficie de células T CD4 de HD preactivadas con PHA (1 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 8g: Esquema del mecanismo de la difusión de IL-7Ralfa introducidos en MMD antes y después de un tratamiento con inhibidores de MMD o inhibidores del citoesqueleto. Los MMD se indican mediante discos, los receptores mediante varillas, y el citoesqueleto se muestra como una red. Se indican las tasas de difusión (rápida, lenta, muy lenta) para facilitar la interpretación de los datos. Este esquema ilustra los resultados que también se indican en la figura 3a.

30

Ejemplo 5: Las cadenas de IL-7R secuestradas en los MMD anómalos de células T CD4 de VP no son funcionales

35 Se miden las tasas de difusión de IL-7R alfa en la superficie de células T CD4 tal como se ha descrito previamente (10, 12) y como se detalla en el ejemplo 4. Antes de cualquier estimulación, se observa que estas tasas de difusión son tres veces más lentas en células T CD4 de VP que de HD (figura 3a). Esto vuelve a demostrar que las cadenas IL-7R alfa están introducidas en MMD anómalos en la superficie de estas células T CD4 (figura 3a). Un tratamiento con COasa más SMasa libera el receptor de sus restricciones por MMD y, por tanto, aumenta su tasa de difusión (figura 3a). Por contraste, un tratamiento con citocalasina D (Cit D) más colchicina (Col) (que desorganiza el citoesqueleto) no produce efecto sobre la tasa de difusión de la cadena IL-7R alfa en células T CD4 de VP (figura 3a). Puesto que la organización del citoesqueleto es una necesidad absoluta para la transducción de señales, esta ausencia de cualquier conexión funcional o estructural entre IL-7R alfa y la red del citoesqueleto sugiere que la señalización no puede producirse cuando los complejos de IL-7R son secuestrados en MMD anómalos, como es el caso en las células T CD4 de VP.

40

45 Entonces se empleó una microscopía de STED pulsada para estudiar la fosforilación de STAT5 (fosfo-STAT5) y el reparto de fosfo-STAT5 en el citoplasma y el núcleo de células T CD4 de HD y VP. La figura 3b muestra imágenes de STED de la distribución de fosfo-STAT5 antes y después de 15 min de estimulación con IL-7. Se advirtió que el fosfo-STAT5 se acumula en el núcleo de células T CD4 de HD, y este fenómeno fue inhibido por la desorganización del citoesqueleto. Por contraste, no se produjo translocación de fosfo-STAT5 al núcleo en células T CD4 de VP ni en las células T CD4 de HD preestimuladas con PHA (figura 3b).

50

Después se siguió la cinética de aparición de fosfo-STAT5 en el citoplasma y el núcleo durante una hora (figura 3c, d, e). Esto demuestra que la fosfo-STAT5 en las células T CD4 de VP se acumula mayoritariamente en el citoplasma y no migra al núcleo (figura 3d), como en las células T CD4 de HD estimuladas con PHA (figura 3e). Esto resultó particularmente evidente cuando los resultados se comparan con los obtenidos en los cinco minutos siguientes a la

estimulación con IL-7 de las células T CD4 de HD, en las que 50% de fosfo-STAT5 se encontró en el núcleo (figura 3c).

Ejemplo 6: El plasma procedente de VP induce MMD anómalos en la superficie de células T CD4 de HD purificadas

5 Después se investigó el origen de la activación aberrante de las células T CD4 de VP. El hecho de que todas las células T CD4 estuviesen implicadas y que una señal no fisiológica, tal como PHA, imita el resultado condujo a una investigación del plasma de VP. Se incubaron células T CD4 de HD purificadas con plasma de VP al 10% durante 30 min y se contaron los MMD en la superficie de las células T CD4, según se detecta mediante la toxina B del cólera marcada (CtxB-AF488). La figura 4a muestra las imágenes obtenidas. El plasma de VP por sí solo un gran número de MMD sobre células T CD4 de HD. La adición de IL-7 no afectó al tamaño o al número de estos MMD (figura 4a).
 10 Estos resultados se muestran para el plasma procedente de cinco VP diferentes (figura 4b) y se verificaron usando muchas más muestras de plasma procedentes de estos VP (> 15). Los experimentos también se repitieron usando células T CD4 procedentes de HD diferentes (> 5). Los controles consistieron en el ensayo de muestras de plasma procedentes de pacientes controladores de VIH ("HIV-controllors", HIC) y tratados con antirretrovíricos ("antiretroviral-treated", ART) en células T CD4 de HD purificadas. Ninguna de estas indujo MMD ni inhibió la inducción de IL-7 de MMD (figura 4c).
 15

Esto se volvió verificó a verificar mediante el ensayo de un gran número de diluciones de los diversos plasmas (figura 4d). El plasma de VP rebajado a una dilución al 0,1% provocó la formación de MMD dispersados a través de la superficie celular. El plasma de VP diluido en 50 a 100 veces produjo 50% de actividad máxima. Ninguna de las muestras de plasma procedentes de pacientes HIC o ART indujo MMD a ninguna dilución.

20 Ejemplo 7: El plasma procedente de VP inhibe la translocación nuclear de fosfo-STAT5 inducida por IL-7

Se ensayó la función de la IL-7R en células T CD4 de HD tratadas con plasma de VP siguiendo la fosforilación de STAT5 y la translocación nuclear. Tal como puede observarse en la figura 5a, la preincubación de células T CD4 de HD con plasma de VP (concentración al 10%) inhibió la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 y su translocación nuclear. La figura 5b muestra los resultados obtenidos con cinco muestras de plasma de VP. En todos los casos, a una dilución del 10% se inhibió la translocación nuclear de fosfo-STAT5. Estos resultados fueron confirmados con plasmas procedentes de VP diferentes (> 15) y diversas fuentes de células T CD4 de HD (>5).
 25

También se ensayó el efecto de plasma derivado de pacientes HIC y ART mediante su preincubación con células T CD4 de HD purificadas (figura 5a y 5c). De nuevo, en este caso, solo el plasma de VP fue capaz de inhibir la translocación nuclear de fosfo-STAT5 inducida por IL-7. También se determinó (figura 5d) que el plasma de VP es activo hasta una dilución del 0,1%, y se obtuvo la actividad semimáxima a una dilución en 50 a 100 veces, lo cual se correlaciona con la capacidad para inducir MMD anómalos (figura 4d).
 30

También se ensayó el efecto de plasma derivado de pacientes tratados ART, pero no respondedores (CD4-NR) a su tratamiento (bajo recuento de ARN vírico y bajo recuento de células T CD4) mediante su preincubación con células T CD4 de HD purificadas. De nuevo, en este caso, solo el plasma de CD4-NR fue capaz de inhibir la translocación nuclear de fosfo-STAT5 inducida por IL-7. También se determinó que el plasma de CD4-NR es activo hasta una dilución del 0,1%, y se obtuvo la actividad semimáxima a una dilución en 50 a 100 veces, lo cual se correlaciona con la capacidad para inducir MMD anómalos, tal como se observa con VP.
 35

Ejemplo 8: Caracterización molecular del factor inductor del estado refractario

40 Se investigó la naturaleza química del RIF. Los estudios realizados (figura 6a) demostraron que el RIF es una proteína, puesto que la tripsina destruyó su actividad. El tratamiento con péptido N-glicanasa (PNGasa) no produjo ningún efecto, lo cual indica que no es necesaria una N-glicosilación para la actividad RIF.

Después se midió el peso molecular de RIF mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna Sephadex G-100. Se midió la inducción de MMD (figura 6b) y la inhibición de la translocación nuclear de fosfo-STAT5 inducida por IL-7 (figura 6c) en todas las fracciones eluidas de la columna. En la figura 6 se muestran dos perfiles de columna representativos. Ambos demuestran que RIF es un único factor, con un PM entre 10 y 15 kDa.
 45

La figura 6b muestra las densidades de los péptidos o proteínas víricas medidas mediante transferencia por puntos en cada una de las 100 fracciones recogidas de la columna Sephadex G100. Las mediciones se repitieron tres veces con diferentes anticuerpos policlonales procedentes de muestras de plasma de VP caracterizadas por su alta actividad contra proteínas víricas. Para cada experimento, las señales obtenidas con los plasmas de HD después se restaron de los valores. El patrón mostrado en la figura 6b demuestra que no se detectaron fragmentos o proteínas víricas en la fracción que contenía actividad RIF, mientras que el ensayo de transferencia por puntos fue capaz de detectar proteínas víricas con un PM mayor (de 190 a 32 kDa).
 50

Después se usaron fracciones enriquecidas activas de 10 a 15 kDa procedentes de las columnas Sephadex G100 para enmarcar el punto isoelectrico de RIF mediante la retención en columnas de intercambio aniónico (MonoQ) o catiónico (MonoS), seguido de una elución de pH (el pH aumenta con MonoS o el pH disminuye con MonoQ) (figura 6d). Después se midió la actividad inductora de MMD de las diversas fracciones de pH después de ajustar su pH a
 55

7,4. En todos los casos, se recuperó del 25 al 30% de la actividad inicial en dos fracciones, un resultado coherente con un punto isoeléctrico de 6,5 a 8,0.

5 Por tanto, RIF es una proteína segregada, con un PM de aproximadamente 15k Da, un pI de aproximadamente 7,5-8,0, que contiene un puente disulfuro. Siguiendo las anteriores características estructurales y funcionales, se obtuvo directamente la identidad de RIF. En particular, de entre las 36853 proteínas humanas conocidas, solo 62 presentaban las anteriores cuatro características de RIF. Se analizó un material semipurificado preparado a partir de tres pacientes virémicos y tres HD usando una espectrometría de masa y el programa Mascot convencional. Las proteínas recuperadas se clasificaron según la puntuación p descrita en la sección de materiales y métodos. Los resultados mostrados en la siguiente tabla 1 indican clara y directamente que RIF es GIBsPLA2.

10 Tabla 1

Mnemotécnica	ID	PI	PM	Punt. de i	Puntuación p	Descripción
PA21B_HUMANA	P04054	7,95	14138,99	9	0,64	Fosfolipasa A2 del grupo 1
TMEM9_HUMANA	Q9P0T7	6,23	18568,37	5	0,29	Proteína transmembrana 9 (TM)
ESM1_HUMANA	Q9NQ30	6,83	18122,42	5	0,10	Molécula spe 1 de células endoteliales
CYTD_HUMANA	P28325	6,76	13858,6	3	0,08	Cistatina-D
SSRB_HUMANA	P43308	7,03	18273,74	7	0,05	Secuencia señal R sub beta (TM)
GPIX_HUMANA	P14770	6,14	17316,06	6	0,04	Glicoproteína IX de plaquetas
B2MG_HUMANA	P61769	7,67	18510,47	4	0,03	Beta-2-microglobulina
EPGN_HUMANA	Q6UW09	7,72	14724,99	1	0,02	Epigén
IL19_HUMANA	Q9UHD0	7,8	17812,56	5	0,02	Interleuquina-19
IL3_HUMANA	P08700	7,05	15091,38	3	0,02	Interleuquina-3
GML_HUMANA	Q99445	6,67	15918,41	7	0,02	Proteína similar a glicosil-PPI-anc
CYTM_HUMANA	P05113	7,02	13149,22	4	0,017	Cistatina-M

15 Por tanto, la proteína encontrada en el plasma de pacientes virémicos es la forma segregada de GIBsPLA2. La proteína madura tiene 125 aa (PM 14138), PI de 7,95 y 7 puentes disulfuro. Usando GIBsPLA2 porcina purificada del mercado, fue posible verificar *in vitro* que esta proteína induce MDM anómalos, que bloquean la translocación nuclear de pSTAT5 IL-7 en el plasma de pacientes virémicos, lo cual vuelve a confirmar que RIF es GIBsPLA2, más específicamente su forma segregada. La secuencia de aminoácidos de GIBsPLA2 humana se proporciona como SEQ ID NO:2.

Ejemplo 9: PLA2sGIB induce la falta de respuesta (anergia) de linfocitos CD4

20 El ejemplo 7 demuestra que PLA2sGIB, a través de la inducción de aMMD, induce un bloqueo de la translocación nuclear de fosfo-STAT5 inducida por IL-7 (NT pSTAT5). Por consiguiente, los linfocitos T CD4 no responde a IL-7 y, a pesar del nivel elevado de esta citoquina en el plasma de pacientes VIH, su número disminuye, lo cual conduce a linfopenia de CD4, la característica de los pacientes infectados por VIH.

En este caso se investigó la posibilidad de que PLA2sGIB también participe en la inducción de la anergia, otra característica de los linfocitos CD4 procedentes de pacientes infectados crónicamente con VIH.

25 Bioensayo

Inducción de MMD:

30 En primer lugar, se incubó plasma de VP que contenía PLA2sGIB (20 min) en medio con células T CD4 de HD. Después las células se cultivaron en portaobjetos de vidrio revestidos de polilisina durante 10 min más. Después se fijaron con paraformaldehído (PFA, al 1,5%, 15 min a 37 °C, seguido de 15 min a temperatura ambiente) antes de teñirse con la toxina B del cólera (CtxB-AF488), y los MMD se contaron mediante microscopía de CW-STED.

Inhibición de la fosforilación de STAT y translocación nuclear:

En primer lugar, el plasma de VP que contenía PLA2sGIB se incubó con células T CD4 de HD purificadas (20 min) antes de una estimulación con IL-7 (2 nM, 15 min). Después las células se cultivaron en portaobjetos de vidrio revestidos de polilisina antes de una fijación con PFA (al 1,5%) y una permeabilización con metanol (90% a - 20 °C). Después pSTAT5 se tiñó con anti-STAT5 de conejo marcado con anti-Atto642 de conejo de cabra y se analizó mediante FACS o microscopía de STED pulsada.

Resultados

La figura 10a demuestra que, después de la exposición a PLA2 GIB (plasma de paciente virémico), los linfocitos CD4 procedentes de donantes sanos (HD) no pudieron responder a IL-2, según se mide mediante la inhibición de NT pSTAT5 inducida por IL-2. Esta inhibición es total con plasma al 3%, y muy significativa con plasma al 1% ($p < 0,0001$).

Después se estudió la respuesta de linfocitos T reg CD4⁺ CD25⁺ a PLA2 GIB. Los resultados se presentan en la figura 10b. Tal como se ilustran, mientras que 100% de las células sanas responden a IL-2 mediante NT pSTAT5, PLA2 GIB (plasma de pacientes virémicos al 1%) inhibe completamente este mecanismo de transducción de señales. Puesto que las células CD4⁺ CD25⁺ representan menos del 5% de las células T CD4 totales, no pueden influir significativamente en los datos presentados en la figura 10a.

IL-7 e IL-2 son miembros de la familia de citoquinas gamma c. Para confirmar que la falta de respuesta a esta citoquina puede estar relacionada con gamma c, se ensayó la respuesta a IL-4. Se midió la respuesta a IL-4 siguiendo la NT de pSTAT6 inducida por IL-4 (figura 11). Los resultados de los inventores demuestran claramente que la respuesta a IL-4 es inhibida por PLA2 GIB (completamente con plasma al 3% y en gran medida por plasma al 1%).

Por tanto, estos resultados demuestran que los mecanismos de señalización inducidos por citoquinas de la familia gamma c son alterados por PLA2 GIB. Esto concuerda totalmente con el descubrimiento de los inventores de que la cadena del receptor de gamma c se encuentra completamente secuestrada en aMMD que se encuentran espontáneamente sobre la superficie de linfocitos CD4 procedentes de pacientes con VIH (los datos no se muestran).

Ejemplo 10: Actividad de las formas recombinantes de PLA2 GIB

En este ejemplo, se ensayó la actividad de diversas formas purificadas de proteínas de PLA2 GIB para confirmar aún más el efecto de esta proteína en forma purificada sobre el sistema inmunológico, y para confirmar aún más su especificidad.

Ensayo enzimático

El ensayo se realizó con el kit de ensayo Enz Check PLA2 de Life Technologies (referencia: E102147). Este ensayo proporciona un control a tiempo real rápido y continuo de las actividades de la enzima de PLA2. La actividad PLA2 se sigue mediante el aumento en la intensidad de una única longitud de onda a 515 nm. PLA2 se detecta mediante cambios en la proporción de intensidad de emisión a 515/575 nm con excitación a 460 nm. Las actividades específicas se expresan en cantidad de sustrato fluorescente (U) obtenido por segundo y por μg de enzima en disolución.

Resultados

Los datos se proporcionan en la siguiente tabla 2.

Tabla 2: Actividad de proteínas de PLA2 GIB recombinantes

PLA2	Naturaleza	Concentración inicial (mg/ml)	Concentración final (ug/ml)	Cantidad (ug)	Actividad específica (U/ug/s)
ppPLA2 IB	De páncreas porcina purificada	2,90	0,58	0,06	7694,31
pPLA2 IB	Porcina recombinante (en <i>E. coli</i>)	1,40	2,80	0,14	10353,57
hPLA2 IB	Humana recombinante (en <i>E. coli</i>)	0,70	1,40	0,07	10694,57
hPLA2 IIA	Humana recombinante (en <i>E. coli</i>)	1,45	2,90	0,15	214,93
hPLA2 IID	Humana recombinante (en <i>E. coli</i>)	0,70	1,40	0,07	445,21

hPLA2 X	Humana recombinante (en <i>E. coli</i>)	0,68	1,36	0,07	3318,97
---------	--	------	------	------	---------

Los resultados demuestran que PLA2 GIB humana recombinante producida en *E. coli* muestra una potente actividad enzimática. Además, los resultados también demuestran que la PLA2GIB porcina recombinante producida en *E. coli* tiene una actividad específica similar a la de la PLA2GIB humana recombinante. Por contraste, PLA2GIIA y PLA2GIID recombinantes no son activas, y PLA2GX tiene una actividad muy limitada.

Por tanto, PLA2 GIB recombinante representa un agente activo potente para su uso en la presente invención.

Ejemplo 11: Los efectos de PLA2sGIB sobre linfocitos CD4 implican a su actividad enzimática

En este ejemplo se investigó si la actividad de PLA2sGIB sobre los linfocitos CD4 implica (por ejemplo, es consecuencia) a una actividad enzimática (por ejemplo, catalítica) de PLA2sGIB. Esta actividad enzimática modificaría la estructura de membrana que conduce a la formación de múltiples aMMD en la superficie de linfocitos CD4.

En estos experimentos, se ensayó un mutante de PLA2sGIB, en el que una histidina crucial en la posición 48 fue reemplazada por glutamina (H48Q mutante). Usando el ensayo enzimático descrito en el ejemplo 10, se comparó la actividad enzimática de PLA2 GIB porcina recombinante producida en *E. coli* con la actividad de H48Q mutante también producida en *E. coli*. Cada proteína se usó a 200 microM. Tal como se muestra en la figura 12, el mutante ha perdido toda su actividad enzimática, lo cual ilustra el papel crucial de la histidina en la posición 48 en PLA2 GIB.

Después se comparó la actividad de PLA2 GIB porcina de tipo salvaje con su H48Q mutante en un bioensayo. Los resultados presentados en la figura 13 demuestran que el mutante ha perdido la capacidad de wtPLA2 GIB de inducir aMMD o de reducir o abrogar la translocación nuclear de pSTAT5 inducida por IL-7 (NT pSTAT5).

Por tanto, estos resultados demuestran que la actividad enzimática está implicada en los efectos patogénicos de PLA2 GIB sobre los linfocitos CD4.

Ejemplo 12: Los anticuerpos anti-GIBsPLA2 restablecen la actividad de células T CD4 en el plasma de pacientes VIH virémicos

Este ejemplo ilustra que, en el plasma de paciente virémico, GIBsPLA2 transforma los linfocitos CD4 procedentes de HD en linfocitos "enfermos", comparables a los caracterizados en la sangre de pacientes infectados por VIH. Este ejemplo demuestra además que los anticuerpos anti-GIBsPLA2 suprimen, de modo eficaz, la actividad patogénica.

En una primera serie de experimentos, el plasma se trató con esferas de Sepharose revestidas con anticuerpos de cabra dirigidos contra GIBsPLA2 humana o con dos anticuerpos de cabra control dirigidos contra antígenos no pertinentes. La figura 14(a) claramente demuestra que los anticuerpos anti-GIBsPLA2 abolen o eliminan completamente la actividad del plasma, que ya no puede inducir MMD anómalos en linfocitos CD4 procedentes de HD. Los anticuerpos control I y control II no produjeron ningún efecto. Estos experimentos se repitieron tres veces para cada plasma y se estudiaron tres plasmas diferentes procedentes de pacientes virémicos.

La figura 14(b) muestra resultados idénticos. En este caso, el plasma se trató como anteriormente, pero se analizó usando el segundo bioensayo. El plasma tratado con esferas de Sepharose revestidas con anticuerpos anti-GIBsPLA2 ya no inhibe la translocación nuclear de pSTAT5 inducida por IL-7. Los anticuerpos de cabra de control I y control II no afectaron a la capacidad del plasma procedente de pacientes virémicos para inhibir la translocación nuclear de pSTAT5 inducida por IL-7.

En una segunda serie de experimentos, se ensayaron los efectos de anticuerpos neutralizantes de conejo dirigidos específicamente contra GIBsPLA2, -GIIA y -GIID. Estos anticuerpos se incubaron con el plasma y las células durante los bioensayos. Los resultados obtenidos demuestran que los anticuerpos anti-GIBsPLA2 neutralizan los efectos del plasma virémico según se mide mediante la inducción de MMD anómalos y mediante la inhibición de la translocación nuclear de pSTAT5 inducida por IL-7. Merece la pena mencionar que los anticuerpos dirigidos contra PLA2-GIIA segregada o PLA2-GIID segregada, dos fosfolipasas que están muy relacionadas con GIBsPLA2, no produjeron ningún efecto en este ensayo.

Estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-GIBsPLA2 pueden revertir y prevenir el efecto inmunosupresor del plasma virémico. Estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-GIBsPLA2 pueden prevenir la inmunodeficiencia y reestimar la respuesta inmunológica en sujetos inmunodeficientes.

Estos resultados también demuestran que la respuesta es específica. GIBsPLA2 es el único efector implicado en el efecto patogénico examinado y que caracteriza al plasma de pacientes virémicos.

Ejemplo 13: Los anticuerpos anti-PLA2 GIB inhiben los efectos de PLA2 GIB sobre células CD4

5 Se usó PLA2G1B humana clonada y purificada para inmunizar conejos. Se prepararon fracciones de inmunoglobulina de los correspondientes sueros. Se midió su capacidad para inhibir la actividad enzimática de PLA2G1B en membranas de *E. coli* radiomarcadas. Se añadieron las fracciones de inmunoglobulina activa al bioensayo que incluyen linfocitos CD4 purificados a partir de la sangre de donantes sanos. Después se añadió PLA2 segregada clonada y purificada (GIB, GIIA, GIID y GX) a los cultivos. Como controles se usaron fracciones de inmunoglobulina preparadas a partir de conejos inmunizados con diversas PLA2 segregadas.

10 La figura 15 demuestra que diferentes concentraciones de anticuerpo policlonal inhiben la inducción de aMMD (figura 15a) y bloquean la NT de pSTAT5 inducida por IL-7 (figura 15b). Esta actividad puede obtenerse desde 1 µg/ml a 100 µg/ml de Ig que contiene anticuerpos anti-PLA2 GIB. Esta actividad es totalmente específica, puesto que los anticuerpos dirigidos contra PLA2 GIIA, PLA2GIID o PLA2GX no produjeron efectos en el bioensayo (figura 15 a y b).

Estos resultados vuelven a demostrar que puede usarse la inhibición de PLA2GIB para tratar inmunodeficiencias y para restablecer la actividad CD4.

Ejemplo 14: El receptor de PLA2GIB soluble inhibe los efectos de PLA2 GIB sobre células T CD4

15 Como otra demostración de que los inhibidores de PLA2GIB pueden ejercer un efecto terapéutico, se ensayó una forma soluble de un receptor de PLA2GIB.

En una primera serie de experimentos, se usó el receptor murino soluble específico de PLA2 GIB que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:22):

```
MVQWLAMLQLLWLQQLLLGLIHQGIAQDLTHIQEPSLEWRDKGIFIIQSES LKTCIQAGK
SVLTLENCKQPNEHMLWKWVSDHDLFNVGGSGCLGLNISALEQPLKLYECDSTLISLRWH
CDRKMIEGPLQYKVQKSDNTVVARKQIHRWIAYTSSGGDICEHPSRDLYTLKGNAGHMP
CVFPFQFKGHHDCIREGQKEHLLWCATTSRYEEDKKGWFCPDPTSMKVFCDATWQRNG
SSRICYQFNLLSSLSWNQAHSSCLMGGALLSIADEDEEDFIRKHLKVVKEVWIGLNQL
DEKAGWQSDGTPLSYLNWSQEITPGPFVEHHCGLTEVVSAAWRSRDCESTLPYICKRDL
NHTAQGILEKDSWKYHATHCDPDWTFPNRKYKLLKDRKSWLGALHSCQSNDSVLMDVAS
LAEVEFLVSLLRDENASETWIGLSSNKIPVSFEWSSGSSVIFTNWYPLEPRI LPNRRQLC
VSAEESDGRWKVKDCCKERLFYICKKAGQVPADEQSGCPAGWERHGRFCYKIDTVLRSFEE
ASSGYYCSPALLTITSRFEQAFITSLISSVAEKDSYFWIALQDQNNNTGEYTWKT VVGQREP
VQYTYWNTRQPSNRGGCVVVRGGSSLGRWEVKDCSDFKAMSLCKTPVKIWEKTELEERWP
FHPCYMDWESATGLASC FKFVHSEKVL MKRSWREAEAFCEEFGAHLASFAHIEEENFVNE
LLHSKFNWTQERQFWIGFNRRNPLNAGSWAWS DGSPVVSSFLDNAYFEEDAKNCAVYKAN
KTL LPSNCASKHEWICRI PRDVRPKFPDWYQYDAPWLFYQNAEYLFHHTHPAEWATFEFVC
GWLRSDFLTIYSAQEQEFIH SKIKGLTKYGVKWWIGLEEGGARDQIQWSNGSPVIFQNW D
KGREERVDSQRKRCVFIS SITGLWGTENCSVPLPSICKRVKIWVIEKEKPPTQPGT C PKG
WLYFNYKCF LVTI PKDPRELKTWTGAQEFCVAKGGTLVSIKSELEQAFITMNLFGQT TNV
WIGLQSTNHEKWN GKPLVYSNWSPSDI INI PSYNTTEFQKH I PLCALMSSNP NFHFTGK
WYFDDCGKEGYGFVCEKMQDTLEHHVNVSDTSAI PSTLEYGNR TYKI IRGNMTWYAAGKS
CRMHRAELASIPDAFHQAFLTVLLSRLGHTHWIGLSTTDNGQTFDWS DGT KSPFTYWKDE
ESAFLGDCAFADTNGRWHSTACESFLQGAICHVVTETKAFEHPGLCSETSV PWIKFKGNC
YSFSTVLD SRSFEDAHEFCSEGSNLLAIRDAAENSFLLEELLAFGSSVQMVWLN AQFDN
NNKTLRWF DGTPT EQSNWGLRKPMDHLKPHPCVVLRI PEGIWHFTPCEDKKGFI CKMEA
GIPAVTAQPEKGLSHSIVPVTVTLTLIIALGIFMLCFWIYKQKSDIFQRLTGS RGSYYPT
LNFSTAHLEENILISDLEKNTNDEEVRDAPATESKRGHKGRPICISP
```

20 El inhibidor se ensayó en el bioensayo descrito en el ejemplo 9, a una concentración de 100 nM. Los resultados se presentan en la figura 16. Estos demuestran que puede usarse un receptor soluble de PLA2 recombinante como potente antagonista, y que dicha molécula es capaz de bloquear significativamente el efecto negativo de PLA2sGIB sobre la NT de pSTAT5 (figura 16).

Pueden obtenerse resultados similares en otros conjuntos de experimentos que emplean polipéptidos de unión a PLA2-GIB que comprenden la secuencia de SEQ ID NO:25 o 28.

Ejemplo 15: La sobreexpresión de GIBsPLA2 induce una deficiencia inmunológica

5 Se ha demostrado previamente que la terapia antirretrovírica muy activa ("Highly Active Anti-Retroviral Therapy", HAART), que reduce la carga vírica, también induce un aumento del recuento de CD4 en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, en algunos pacientes, a pesar del hecho de que el VIH se hace indetectable, los recuentos de CD4 no aumentan. Los inventores han estudiado previamente esta situación clínica y han demostrado que, en estos pacientes denominados CD4 no respondedores (CD4-NR), aparecen defectos fuertes y persistentes en la población de linfocitos T CD4.

10 La figura 17 demuestra que el plasma de pacientes CD4-NR contiene más actividad PLA2 GIB que el plasma procedente de un paciente vírico tomado como control. Esto se midió en primer lugar mediante la inducción de MMD anómalos por célula. Estos datos también fueron confirmados midiendo la capacidad para inhibir la translocación nuclear de pSTAT5 inducida por IL-7.

15 Tomados conjuntamente, los resultados demuestran que el plasma de los pacientes CD4-NR contiene cientos de veces más actividad PLA2 GIB que el plasma procedente de pacientes víricos.

Análisis

20 Los resultados de los inventores demuestran que PLA2 GIB induce una inmunosupresión similar a la que caracteriza a las células T CD4 procedentes de pacientes víricos, incluyendo la incapacidad para responder a IL-2 (anergia) y a IL-7 (mecanismo central hacia la linfopenia de CD4). Por tanto, la expresión de GIBsPLA2 durante una infección por VIH desempeña un papel central en la patofisiología de la enfermedad inmunológica que caracteriza a estos pacientes. Estos defectos son específicos del tipo de célula, puesto que los linfocitos T CD8 procedentes de pacientes con VIH no muestran MMD anómalos y continúan respondiendo a IL-7 (los datos no se muestran). El modo de acción PLA2 GIB probablemente es consecuencia de su actividad enzimática. Mediante el ataque a la membrana del linfocito CD4 se modifica su fluidez y esto probablemente permite la formación de MMD muy grandes y anómalos.

30 Las reacciones inflamatorias desempeñan un papel importante durante la infección por VIH. Sin embargo, su papel exacto en la patogénesis del VIH sigue sin aclararse. Tomando en consideración los datos de los inventores, se puede establecer la hipótesis de que la infección por VIH induce un tipo muy peculiar de inflamación que incluye a GIBsPLA2. Además, se puede especular que, después de la inducción de PLA2 GIB, su secreción escapa a los procesos reguladores normales, conduciendo, por tanto, a una producción crónica y a trastornos inmunológicos, que son la consecuencia directa de la disfunción de los linfocitos T CD4. Como consecuencia indirecta de la disfunción de los linfocitos T CD4, también pueden observarse otros defectos. Por ejemplo, una producción disminuida de interferón gamma disminuirá las funciones de monocitos/macrófagos y de asesinas naturales.

35 La correlación entre la recuperación de la actividad PLA2 GIB plasmática y las características de diferentes grupos de paciente también proporciona mucha información. Los "controladores de VIH" son pacientes muy poco habituales que mantienen una carga vírica indetectable y recuentos de CD4 cuasinormales a lo largo de los años. Los resultados de los inventores demuestran que no expresan actividad PLA2 GIB en su plasma. Por contraste, en la mayoría de los pacientes, esta enzima se expresa y representa el lado negativo de la inflamación que conduce a la enfermedad inmunológica. De modo global, esto claramente establece que PLA2 GIB es un parámetro muy crucial en la patofisiología de la infección por VIH.

45 A la disminución de la carga vírica en HAART le sigue un restablecimiento inmunológico, que incluye un aumento en los recuentos de CD4. Durante este tratamiento, la actividad PLA2 GIB desaparece en el plasma de los pacientes. Puesto que se considera que HAART disminuye las reacciones inflamatorias, esto también sugiere que PLA2 GIB es parte de estos procesos inflamatorios. De manera más importante, en la presente se describe el caso de los pacientes CD4-NR que permanecen con recuentos de CD4 muy bajos, mientras que HAART controla su carga vírica. La sobreproducción de PLA2 GIB que se encuentra en estos individuos puede explicar la persistencia de la enfermedad inmunológica que caracteriza este estado clínico. Por tanto, después de HAART, se produce una fuerte correlación entre la producción disminuida de PLA2 GIB que conduce al restablecimiento inmunológico, o su persistente sobreproducción que conduce a la irreversibilidad de la enfermedad inmunológica.

50 Las consecuencias terapéuticas y utilidades de este descubrimiento son inmensas. En efecto, la inhibición de PLA2 GIB puede usarse para prevenir o curar la enfermedad inmunológica de pacientes con VIH, así como, de modo más general, de sujetos inmunodeprimidos. Aplicados de modo temprano durante la infección, los inhibidores de PLA2 GIB conducen a los pacientes hacia un estado de controlador de VIH. Aplicados más tarde, por sí solos o junto con/en alternancia con HAART, aceleran la recuperación de las funciones de los linfocitos T CD4, y mediante el refuerzo de las defensas del hospedante, los inhibidores de PLA2 GIB conducen a un equilibrio entre el virus y el sistema inmunológico, al igual que en muchas otras infecciones crónicas víricas. Por tanto, los inhibidores de PLA2 GIB representa agentes muy potentes para su uso, por sí solos o en combinación, para tratar trastornos asociados

con una actividad o respuesta inmunológica anómala. También pueden ayudar a no tomar HAART y podrían conducir a la interrupción de estos tratamientos, conocidos por sus graves efectos perjudiciales.

Además, puesto que la falta de expresión de GIBsPLA2 (como en ratones KO para el correspondiente gen) es bien tolerada, la supresión transitoria o permanente de GIBsPLA2 usando inhibidores o a través de una vacunación, representa una inmunoterapia potente y válida de trastornos inmunológicos, en particular en pacientes con VIH.

Referencias bibliográficas

- (1) Grossman Z., Meier-Schellersheim M., Sousa A.E., Victorino R.M.M., Paul W.E. (2002), CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause?, *Nat. Med.*, 8(4):319-323.
- (2) Catalfamo M., *et al.* (2008). HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells, *PNAS*. 105(50):19851-19856.
- (3) Armah K.A., *et al.* (2012), HIV status, burden of comorbid disease and biomarkers of inflammation, altered coagulation, and monocyte activation, *Clin. Infec. Dis.*, 55(1):126-136.
- (4) David D., *et al.* (1998), Regulatory dysfunction of the Interleukin-2 receptor during HIV-infection and the impact of triple combination therapy. *PNAS*, 95:11348-11353.
- (5) Colle J.H., *et al.* (2006), Regulatory dysfunction of the interleukin-7 receptor in CD4 and CD8 lymphocytes from HIV-infected patients - effects of antiretroviral therapy, *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, 42(3):277-285.
- (6) Kryworuchko M., Pasquier V., Thèze J, (2003), Human Immunodeficiency Virus - 1 envelope glycoproteins and anti-CD4 antibodies inhibit Interleukin-2 induced Jack/STAT signaling in human CD4 T lymphocytes, *Clinical and Experimental Immunology*, 131(3):422-427.
- (7) Landires I., *et al.* (2011), HIV infection perturbs IL-7 signaling at the step of STAT5 nuclear relocalization, *AIDS*, 25(15):1443-1453.
- (8) Vranjkovic A., Crawley A.M., Patey A., Angel J.B. (2011), IL-7 dependent STAT-5 activation and CD8+ T cell proliferation are impaired in HIV infection, *J. Leukoc. Biol.*, 89(4):499-506.
- (9) Benoit A., *et al.* (2009), Inverse association of repressor growth factor independent-1 with CD8 T cell interleukin (IL)-7 receptor [alpha] expression and limited signal transducers and activators of transcription signaling in response to IL-7 among [gamma]-chain cytokines in HIV patients, *AIDS*, 23(11):1341-1347.
- (10) Rose T., *et al.* (2010), Interleukine-7 compartimentilizes its receptor signaling complex to initiate CD4 T lymphocyte response, *J. Biol. Chem.*, 285(20):14898-14908.
- (11) Lingwood D., Simons K. (2010), Lipid rafts as a membrane-organizing principle, *Science*, 327(5961):46-50.
- (12) Tamarit B., *et al.* (2013), Membrane microdomains and cytoskeleton organisation shape and regulate the IL-7-receptor signalosome in human CD4 T-cells, *J. Biol. Chem.*
- (13) Beq S., *et al.* (2004), HIV infection: pre-highly active antiretroviral therapy IL-7 plasma levels correlate with long term CD4 cell count increase after treatment, *AIDS*, 18(3):563-565.
- (14) Rose T., Lambotte O., Pallier C., Delraissy J.F., Colle J.H. (2009), Identification and biochemical characterization of human plasma soluble IL-7R: lower concentrations in HIV-1 infected patients, *J. Immunol.*, 182(12):7389-7397.
- (15) Sauce D., Elbim C., Appay V. (2013), Monitoring cellular immune markers in HIV infection: from activation to exhaustion, *Curr. Opin. HIV AIDS*, 8:125-131.
- (16) Younes S.A., *et al.* (2003), HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin-2 producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity, *J. Exp. Med.*, 198:1909-1922.
- (17) Sirskiy D., Thèze J., Kumar A., Kryworuchko M. (2008), Disruption of the gamma c cytokine network in T cells during HIV infection, *Cytokine*, 43(1):1-14.
- (18) Pallikkuth S., Parmigiani A., Pahwa S. (2012), The role of interleukin-21 in HIV infection, *Cytokine*, 23(4-5):173-180.
- (19) Vingert B., *et al.* (2012), HIV Controllers maintain a population of highly efficient TH1 effector in contrast to patients treated in the long term, *J. Virol.*, 86(19):10661-10674.
- (20) Sandler N.G., Douek D.C. (2012), Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities, *Nat. Rev. Microbiol.*, 10(9):655-666.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT PASTEUR
 <120> Composiciones y métodos terapéuticos
 5 <130> B1834
 <160> 31
 <170> PatentIn versión 3.3
 10 <210> 1
 <211> 447
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> ADNc que codifica hGIBsPLA2
 <400> 1
 atgaaactcc ttgtgctagc tgtgctgctc acagtggccg cgcgcgacag cggcatcagc 60
 cctcggggccg tgtggcagtt ccgcaaaatg atcaagtgcg tgatcccggg gaggtagcccc 120
 ttcttggaat acaacaacta cggctgctac tgtggcttgg ggggctcagg caccctcgtg 180
 gatgaactgg acaagtgctg ccagacacat gacaactgct acgaccaggc caagaagctg 240
 gacagctgta aatttctgct ggacaaccog tacaccaca cctattcata ctctgtctct 300
 ggctcggcaa tcacctgtag cagcaaaaac aaagagtgtg aggccttcat ttgcaactgc 360
 gaccgcaacg ctgccatctg cttttcaaaa gctccatata acaaggcaca caagaacctg 420
 20 gacaccaaga agtattgtca gagttga 447
 <210> 2
 <211> 148
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> hGIBsPLA2
 30 <400> 2
 Met Lys Leu Leu Val Leu Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Ser Gly Ile Ser Pro Arg Ala Val Trp Gln Phe Arg Lys Met Ile Lys
 20 25 30
 Cys Val Ile Pro Gly Ser Asp Pro Phe Leu Glu Tyr Asn Asn Tyr Gly
 35 40 45
 Cys Tyr Cys Gly Leu Gly Gly Ser Gly Thr Pro Val Asp Glu Leu Asp
 50 55 60

ES 2 812 542 T3

Lys Cys Cys Gln Thr His Asp Asn Cys Tyr Asp Gln Ala Lys Lys Leu
 65 70 75 80

Asp Ser Cys Lys Phe Leu Leu Asp Asn Pro Tyr Thr His Thr Tyr Ser
 85 90 95

Tyr Ser Cys Ser Gly Ser Ala Ile Thr Cys Ser Ser Lys Asn Lys Glu
 100 105 110

Cys Glu Ala Phe Ile Cys Asn Cys Asp Arg Asn Ala Ala Ile Cys Phe
 115 120 125

Ser Lys Ala Pro Tyr Asn Lys Ala His Lys Asn Leu Asp Thr Lys Lys
 130 135 140

Tyr Cys Gln Ser
 145

- 5 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

- 10 <220>
 <223> Molécula de ácido nucleico inhibidor

 <400> 3
 atgaaactcc ttgtgctag 19

- 15 <210> 4
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Artificial

- 20 <220>
 <223> Molécula de ácido nucleico inhibidor

 <400> 4
 acagcggcat cagc 14

- 25 <210> 5
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

- 30 <220>
 <223> Molécula de ácido nucleico inhibidor

 <400> 5
 ttccgcaaaa tgatcaa 17

- 35 <210> 6
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

- 40 <220>
 <223> Molécula de ácido nucleico inhibidor

 <400> 6
 cccggggagt gacccc 16

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Molécula de ácido nucleico inhibidor
 <400> 7
 10 tacggctgct actgtggct 20
 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Molécula de ácido nucleico inhibidor
 20 <400> 8
 gacacatgac aactgctacg acc 23
 <210> 9
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Molécula de ácido nucleico inhibidor
 30 <400> 9
 acccacacct attcatactc gt 22
 <210> 10
 <211> 16
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Molécula de ácido nucleico inhibidor
 <400> 10
 atcacctgta gcagca 16
 45 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Molécula de ácido nucleico inhibidor
 <400> 11
 55 agctccatat aacaaggca 19
 <210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Molécula de ácido nucleico inhibidor
 <400> 12
 65 caagaagtat tgtcagag 18

<210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido inmunogénico
 <400> 13
 Asn Asn Tyr Gly Cys Tyr
 10 1 5
 <210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido inmunogénico
 <400> 14
 Cys Tyr Cys Gly Leu Gly
 20 1 5
 <210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Péptido inmunogénico
 <400> 15
 Tyr Asn Asn Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Leu Gly Gly Ser Gly
 30 1 5 10
 <210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Péptido inmunogénico
 <400> 16
 Phe Leu Glu Tyr Asn Asn Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Leu Gly Gly Ser
 40 1 5 10 15
 Gly Thr Pro Val
 20
 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Péptido inmunogénico
 <400> 17
 Gln Thr His Asp Asn
 50 1 5
 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 55

<213> Artificial

<220>
<223> Péptido inmunogénico

5 <400> 18
Cys Gln Thr His Asp Asn Cys
1 5

10 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido inmunogénico

<400> 19
Glu Cys Glu Ala Phe Ile Cys Asn Cys
1 5

20 <210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Péptido inmunogénico

<400> 20
Asp Arg Asn Ala Ala Ile
1 5

30 <210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Péptido inmunogénico

<400> 21
Asp Arg Asn Ala Ala Ile Cys Phe Ser Lys Ala Pro Tyr Asn Lys Ala
1 5 10 15

40 His Lys Asn Leu
20

<210> 22
<211> 1487
<212> PRT

45 <213> Artificial

<220>
<223> receptor soluble

50 <400> 22

ES 2 812 542 T3

Met	Val	Gln	Trp	Leu	Ala	Met	Leu	Gln	Leu	Leu	Trp	Leu	Gln	Gln	Leu
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Gly	Ile	His	Gln	Gly	Ile	Ala	Gln	Asp	Leu	Thr	His	Ile
			20					25					30		
Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Glu	Trp	Arg	Asp	Lys	Gly	Ile	Phe	Ile	Ile	Gln
		35					40					45			
Ser	Glu	Ser	Leu	Lys	Thr	Cys	Ile	Gln	Ala	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Thr
	50					55					60				
Leu	Glu	Asn	Cys	Lys	Gln	Pro	Asn	Glu	His	Met	Leu	Trp	Lys	Trp	Val
65					70					75					80
Ser	Asp	Asp	His	Leu	Phe	Asn	Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Cys	Leu	Gly	Leu
			85						90					95	
Asn	Ile	Ser	Ala	Leu	Glu	Gln	Pro	Leu	Lys	Leu	Tyr	Glu	Cys	Asp	Ser
			100					105					110		

ES 2 812 542 T3

Thr Leu Ile Ser Leu Arg Trp His Cys Asp Arg Lys Met Ile Glu Gly
 115 120 125

Pro Leu Gln Tyr Lys Val Gln Val Lys Ser Asp Asn Thr Val Val Ala
 130 135 140

Arg Lys Gln Ile His Arg Trp Ile Ala Tyr Thr Ser Ser Gly Gly Asp
 145 150 155 160

Ile Cys Glu His Pro Ser Arg Asp Leu Tyr Thr Leu Lys Gly Asn Ala
 165 170 175

His Gly Met Pro Cys Val Phe Pro Phe Gln Phe Lys Gly His Trp His
 180 185 190

His Asp Cys Ile Arg Glu Gly Gln Lys Glu His Leu Leu Trp Cys Ala
 195 200 205

Thr Thr Ser Arg Tyr Glu Glu Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp
 210 215 220

Pro Thr Ser Met Lys Val Phe Cys Asp Ala Thr Trp Gln Arg Asn Gly
 225 230 235 240

Ser Ser Arg Ile Cys Tyr Gln Phe Asn Leu Leu Ser Ser Leu Ser Trp
 245 250 255

Asn Gln Ala His Ser Ser Cys Leu Met Gln Gly Gly Ala Leu Leu Ser
 260 265 270

Ile Ala Asp Glu Asp Glu Glu Asp Phe Ile Arg Lys His Leu Ser Lys
 275 280 285

Val Val Lys Glu Val Trp Ile Gly Leu Asn Gln Leu Asp Glu Lys Ala
 290 295 300

Gly Trp Gln Trp Ser Asp Gly Thr Pro Leu Ser Tyr Leu Asn Trp Ser
 305 310 315 320

Gln Glu Ile Thr Pro Gly Pro Phe Val Glu His His Cys Gly Thr Leu
 325 330 335

Glu Val Val Ser Ala Ala Trp Arg Ser Arg Asp Cys Glu Ser Thr Leu
 340 345 350

Pro Tyr Ile Cys Lys Arg Asp Leu Asn His Thr Ala Gln Gly Ile Leu

ES 2 812 542 T3

355	360	365																				
Glu	Lys	Asp	Ser	Trp	Lys	Tyr	His	Ala	Thr	His	Cys	Asp	Pro	Asp	Trp							
370						375					380											
Thr	Pro	Phe	Asn	Arg	Lys	Cys	Tyr	Lys	Leu	Lys	Lys	Asp	Arg	Lys	Ser							
385					390					395					400							
Trp	Leu	Gly	Ala	Leu	His	Ser	Cys	Gln	Ser	Asn	Asp	Ser	Val	Leu	Met							
				405					410					415								
Asp	Val	Ala	Ser	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Phe	Leu	Val	Ser	Leu	Leu	Arg							
			420					425					430									
Asp	Glu	Asn	Ala	Ser	Glu	Thr	Trp	Ile	Gly	Leu	Ser	Ser	Asn	Lys	Ile							
		435					440						445									
Pro	Val	Ser	Phe	Glu	Trp	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Val	Ile	Phe	Thr	Asn							
	450					455					460											
Trp	Tyr	Pro	Leu	Glu	Pro	Arg	Ile	Leu	Pro	Asn	Arg	Arg	Gln	Leu	Cys							
465					470					475					480							
Val	Ser	Ala	Glu	Glu	Ser	Asp	Gly	Arg	Trp	Lys	Val	Lys	Asp	Cys	Lys							
				485					490					495								
Glu	Arg	Leu	Phe	Tyr	Ile	Cys	Lys	Lys	Ala	Gly	Gln	Val	Pro	Ala	Asp							
			500					505					510									
Glu	Gln	Ser	Gly	Cys	Pro	Ala	Gly	Trp	Glu	Arg	His	Gly	Arg	Phe	Cys							
		515					520					525										
Tyr	Lys	Ile	Asp	Thr	Val	Leu	Arg	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Ser	Ser	Gly							
	530					535					540											
Tyr	Tyr	Cys	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ile	Thr	Ser	Arg	Phe	Glu	Gln							
545					550					555					560							
Ala	Phe	Ile	Thr	Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Val	Ala	Glu	Lys	Asp	Ser	Tyr							
				565					570					575								
Phe	Trp	Ile	Ala	Leu	Gln	Asp	Gln	Asn	Asn	Thr	Gly	Glu	Tyr	Thr	Trp							
			580					585					590									
Lys	Thr	Val	Gly	Gln	Arg	Glu	Pro	Val	Gln	Tyr	Thr	Tyr	Trp	Asn	Thr							
		595					600						605									

ES 2 812 542 T3

Arg Gln Pro Ser Asn Arg Gly Gly Cys Val Val Val Arg Gly Gly Ser
 610 615 620

Ser Leu Gly Arg Trp Glu Val Lys Asp Cys Ser Asp Phe Lys Ala Met
 625 630 635 640

Ser Leu Cys Lys Thr Pro Val Lys Ile Trp Glu Lys Thr Glu Leu Glu
 645 650 655

Glu Arg Trp Pro Phe His Pro Cys Tyr Met Asp Trp Glu Ser Ala Thr
 660 665 670

Gly Leu Ala Ser Cys Phe Lys Val Phe His Ser Glu Lys Val Leu Met
 675 680 685

Lys Arg Ser Trp Arg Glu Ala Glu Ala Phe Cys Glu Glu Phe Gly Ala
 690 695 700

His Leu Ala Ser Phe Ala His Ile Glu Glu Glu Asn Phe Val Asn Glu
 705 710 715 720

Leu Leu His Ser Lys Phe Asn Trp Thr Gln Glu Arg Gln Phe Trp Ile
 725 730 735

Gly Phe Asn Arg Arg Asn Pro Leu Asn Ala Gly Ser Trp Ala Trp Ser
 740 745 750

Asp Gly Ser Pro Val Val Ser Ser Phe Leu Asp Asn Ala Tyr Phe Glu
 755 760 765

Glu Asp Ala Lys Asn Cys Ala Val Tyr Lys Ala Asn Lys Thr Leu Leu
 770 775 780

Pro Ser Asn Cys Ala Ser Lys His Glu Trp Ile Cys Arg Ile Pro Arg
 785 790 795 800

Asp Val Arg Pro Lys Phe Pro Asp Trp Tyr Gln Tyr Asp Ala Pro Trp
 805 810 815

Leu Phe Tyr Gln Asn Ala Glu Tyr Leu Phe His Thr His Pro Ala Glu
 820 825 830

Trp Ala Thr Phe Glu Phe Val Cys Gly Trp Leu Arg Ser Asp Phe Leu
 835 840 845

Thr Ile Tyr Ser Ala Gln Glu Gln Glu Phe Ile His Ser Lys Ile Lys
 850 855 860

ES 2 812 542 T3

Gly Leu Thr Lys Tyr Gly Val Lys Trp Trp Ile Gly Leu Glu Glu Gly
865 870 875 880

Gly Ala Arg Asp Gln Ile Gln Trp Ser Asn Gly Ser Pro Val Ile Phe
885 890 895

Gln Asn Trp Asp Lys Gly Arg Glu Glu Arg Val Asp Ser Gln Arg Lys
900 905 910

Arg Cys Val Phe Ile Ser Ser Ile Thr Gly Leu Trp Gly Thr Glu Asn
915 920 925

Cys Ser Val Pro Leu Pro Ser Ile Cys Lys Arg Val Lys Ile Trp Val
930 935 940

Ile Glu Lys Glu Lys Pro Pro Thr Gln Pro Gly Thr Cys Pro Lys Gly
945 950 955 960

Trp Leu Tyr Phe Asn Tyr Lys Cys Phe Leu Val Thr Ile Pro Lys Asp
965 970 975

Pro Arg Glu Leu Lys Thr Trp Thr Gly Ala Gln Glu Phe Cys Val Ala
980 985 990

Lys Gly Gly Thr Leu Val Ser Ile Lys Ser Glu Leu Glu Gln Ala Phe
995 1000 1005

Ile Thr Met Asn Leu Phe Gly Gln Thr Thr Asn Val Trp Ile Gly
1010 1015 1020

Leu Gln Ser Thr Asn His Glu Lys Trp Val Asn Gly Lys Pro Leu
1025 1030 1035

Val Tyr Ser Asn Trp Ser Pro Ser Asp Ile Ile Asn Ile Pro Ser
1040 1045 1050

Tyr Asn Thr Thr Glu Phe Gln Lys His Ile Pro Leu Cys Ala Leu
1055 1060 1065

Met Ser Ser Asn Pro Asn Phe His Phe Thr Gly Lys Trp Tyr Phe
1070 1075 1080

Asp Asp Cys Gly Lys Glu Gly Tyr Gly Phe Val Cys Glu Lys Met
1085 1090 1095

Gln Asp Thr Leu Glu His His Val Asn Val Ser Asp Thr Ser Ala
1100 1105 1110

ES 2 812 542 T3

Ile Pro Ser Thr Leu Glu Tyr Gly Asn Arg Thr Tyr Lys Ile Ile
 1115 1120 1125

Arg Gly Asn Met Thr Trp Tyr Ala Ala Gly Lys Ser Cys Arg Met
 1130 1135 1140

His Arg Ala Glu Leu Ala Ser Ile Pro Asp Ala Phe His Gln Ala
 1145 1150 1155

Phe Leu Thr Val Leu Leu Ser Arg Leu Gly His Thr His Trp Ile
 1160 1165 1170

Gly Leu Ser Thr Thr Asp Asn Gly Gln Thr Phe Asp Trp Ser Asp
 1175 1180 1185

Gly Thr Lys Ser Pro Phe Thr Tyr Trp Lys Asp Glu Glu Ser Ala
 1190 1195 1200

Phe Leu Gly Asp Cys Ala Phe Ala Asp Thr Asn Gly Arg Trp His
 1205 1210 1215

Ser Thr Ala Cys Glu Ser Phe Leu Gln Gly Ala Ile Cys His Val
 1220 1225 1230

Val Thr Glu Thr Lys Ala Phe Glu His Pro Gly Leu Cys Ser Glu
 1235 1240 1245

Thr Ser Val Pro Trp Ile Lys Phe Lys Gly Asn Cys Tyr Ser Phe
 1250 1255 1260

Ser Thr Val Leu Asp Ser Arg Ser Phe Glu Asp Ala His Glu Phe
 1265 1270 1275

Cys Lys Ser Glu Gly Ser Asn Leu Leu Ala Ile Arg Asp Ala Ala
 1280 1285 1290

Glu Asn Ser Phe Leu Leu Glu Glu Leu Leu Ala Phe Gly Ser Ser
 1295 1300 1305

Val Gln Met Val Trp Leu Asn Ala Gln Phe Asp Asn Asn Asn Lys
 1310 1315 1320

Thr Leu Arg Trp Phe Asp Gly Thr Pro Thr Glu Gln Ser Asn Trp
 1325 1330 1335

Gly Leu Arg Lys Pro Asp Met Asp His Leu Lys Pro His Pro Cys

ES 2 812 542 T3

1340 1345 1350

Val Val Leu Arg Ile Pro Glu Gly Ile Trp His Phe Thr Pro Cys
1355 1360 1365

Glu Asp Lys Lys Gly Phe Ile Cys Lys Met Glu Ala Gly Ile Pro
1370 1375 1380

Ala Val Thr Ala Gln Pro Glu Lys Gly Leu Ser His Ser Ile Val
1385 1390 1395

Pro Val Thr Val Thr Leu Thr Leu Ile Ile Ala Leu Gly Ile Phe
1400 1405 1410

Met Leu Cys Phe Trp Ile Tyr Lys Gln Lys Ser Asp Ile Phe Gln
1415 1420 1425

Arg Leu Thr Gly Ser Arg Gly Ser Tyr Tyr Pro Thr Leu Asn Phe
1430 1435 1440

Ser Thr Ala His Leu Glu Glu Asn Ile Leu Ile Ser Asp Leu Glu
1445 1450 1455

Lys Asn Thr Asn Asp Glu Glu Val Arg Asp Ala Pro Ala Thr Glu
1460 1465 1470

Ser Lys Arg Gly His Lys Gly Arg Pro Ile Cys Ile Ser Pro
1475 1480 1485

<210> 23
 5 <211> 1326
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> receptor soluble

<400> 23
 Met Leu Leu Ser Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Cys Ala Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Thr Pro Glu Arg Leu
 20 25 30

Leu Glu Trp Gln Asp Lys Gly Ile Phe Val Ile Gln Ser Glu Ser Leu
 35 40 45

Lys Lys Cys Ile Gln Ala Gly Lys Ser Val Leu Thr Leu Gly Arg Thr
 50 55 60

ES 2 812 542 T3

Gly Ser Lys Gln Ala Asn Lys His Met Leu Trp Lys Trp Val Ser Asn
65 70 75 80

His Gly Leu Phe Asn Ile Gly Gly Ser Gly Cys Leu Gly Leu Asn Phe
85 90 95

Ser Ala Pro Glu Gln Pro Leu Ser Leu Tyr Glu Cys Asp Ser Thr Leu
100 105 110

Val Ser Leu Arg Trp Arg Cys Asn Arg Lys Met Ile Thr Gly Pro Leu
115 120 125

Gln Tyr Ser Val Gln Val Ala His Asp Asn Thr Val Val Ala Ser Arg
130 135 140

Lys Tyr Ile His Lys Trp Ile Ser Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile
145 150 155 160

Cys Glu Tyr Leu His Lys Asp Leu His Thr Ile Lys Gly Asn Thr His
165 170 175

Gly Met Pro Cys Met Phe Pro Phe Gln Tyr Asn His Gln Trp His His
180 185 190

Glu Cys Thr Arg Glu Gly Arg Glu Asp Asp Leu Leu Trp Cys Ala Thr
195 200 205

Thr Ser Arg Tyr Glu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp Pro
210 215 220

Thr Ser Ala Glu Val Gly Cys Asp Thr Ile Trp Glu Lys Asp Leu Asn
225 230 235 240

Ser His Ile Cys Tyr Gln Phe Asn Leu Leu Ser Ser Leu Ser Trp Ser
245 250 255

Glu Ala His Ser Ser Cys Gln Met Gln Gly Gly Thr Leu Leu Ser Ile
260 265 270

Thr Asp Glu Thr Glu Glu Asn Phe Ile Arg Glu His Met Ser Ser Lys
275 280 285

Thr Val Glu Val Trp Val Gly Leu Asn Gln Leu Asp Glu Asp Ala Gly
290 295 300

Trp Gln Trp Ser Asp Gly Thr Pro Leu Asn Tyr Leu Asn Trp Ser Pro

ES 2 812 542 T3

305		310		315		320
Glu Val Asn Phe Glu Pro Phe Val Glu Asp His Cys Gly Thr Phe Ser		325		330		335
Ser Phe Met Pro Ser Ala Trp Arg Ser Arg Asp Cys Glu Ser Thr Leu		340		345		350
Pro Tyr Ile Cys Lys Lys Tyr Leu Asn His Ile Asp His Glu Ile Val		355		360		365
Glu Lys Asp Ala Trp Lys Tyr Tyr Ala Thr His Cys Glu Pro Gly Trp		370		375		380
Asn Pro Tyr Asn Arg Asn Cys Tyr Lys Leu Gln Lys Glu Glu Lys Thr		385		390		395
Trp His Glu Ala Leu Arg Ser Cys Gln Ala Asp Asn Ser Ala Leu Ile		405		410		415
Asp Ile Thr Ser Leu Ala Glu Val Glu Phe Leu Val Thr Leu Leu Gly		420		425		430
Asp Glu Asn Ala Ser Glu Thr Trp Ile Gly Leu Ser Ser Asn Lys Ile		435		440		445
Pro Val Ser Phe Glu Trp Ser Asn Asp Ser Ser Val Ile Phe Thr Asn		450		455		460
Trp His Thr Leu Glu Pro His Ile Phe Pro Asn Arg Ser Gln Leu Cys		465		470		475
Val Ser Ala Glu Gln Ser Glu Gly His Trp Lys Val Lys Asn Cys Glu		485		490		495
Glu Arg Leu Phe Tyr Ile Cys Lys Lys Ala Gly His Val Leu Ser Asp		500		505		510
Ala Glu Ser Gly Cys Gln Glu Gly Trp Glu Glu Thr Cys Gly Phe Cys		515		520		525
Tyr Lys Ile Asp Thr Val Leu Arg Ser Phe Asp Gln Ala Ser Ser Gly		530		535		540
Tyr Tyr Cys Pro Pro Ala Leu Val Thr Ile Thr Asn Arg Phe Glu Gln		545		550		555
						560

ES 2 812 542 T3

Ala Phe Ile Thr Ser Leu Ile Ser Ser Val Val Lys Met Lys Asp Ser
565 570 575

Tyr Phe Trp Ile Ala Leu Gln Asp Gln Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Thr
580 585 590

Trp Lys Pro Val Gly Gln Lys Pro Glu Pro Val Gln Tyr Thr His Trp
595 600 605

Asn Thr His Gln Pro Arg Tyr Ser Gly Gly Cys Val Ala Met Arg Gly
610 615 620

Arg His Pro Leu Gly Arg Trp Glu Val Lys His Cys Arg His Phe Lys
625 630 635 640

Ala Met Ser Leu Cys Lys Gln Pro Val Glu Asn Gln Glu Lys Ala Glu
645 650 655

Tyr Glu Glu Arg Trp Pro Phe His Pro Cys Tyr Leu Asp Trp Glu Ser
660 665 670

Glu Pro Gly Leu Ala Ser Cys Phe Lys Val Phe His Ser Glu Lys Val
675 680 685

Leu Met Lys Arg Thr Trp Arg Glu Ala Glu Ala Phe Cys Glu Glu Phe
690 695 700

Gly Ala His Leu Ala Ser Phe Ala His Ile Glu Glu Glu Asn Phe Val
705 710 715 720

Asn Glu Leu Leu His Pro Lys Phe Asn Trp Thr Glu Glu Arg Gln Phe
725 730 735

Trp Ile Gly Phe Asn Lys Arg Asn Pro Leu Asn Ala Gly Ser Trp Glu
740 745 750

Trp Ser Asp Arg Thr Pro Val Val Ser Ser Phe Leu Asp Asn Thr Tyr
755 760 765

Phe Gly Glu Asp Ala Arg Asn Cys Ala Val Tyr Lys Pro Asn Lys Thr
770 775 780

Leu Leu Pro Leu His Cys Gly Ser Lys Arg Glu Trp Ile Cys Lys Ile
785 790 795 800

Pro Arg Asp Val Lys Pro Lys Ile Pro Phe Trp Tyr Gln Tyr Asp Val
805 810 815

ES 2 812 542 T3

Pro Trp Leu Phe Tyr Gln Asp Ala Glu Tyr Leu Phe His Thr Phe Ala
 820 825 830

Ser Glu Trp Leu Asn Phe Glu Phe Val Cys Ser Trp Leu His Ser Asp
 835 840 845

Leu Leu Thr Ile His Ser Ala His Glu Gln Glu Phe Ile His Ser Lys
 850 855 860

Ile Lys Ala Leu Ser Lys Tyr Gly Ala Ser Trp Trp Ile Gly Leu Gln
 865 870 875 880

Glu Glu Arg Ala Asn Asp Glu Phe Arg Trp Arg Asp Gly Thr Pro Val
 885 890 895

Ile Tyr Gln Asn Trp Asp Thr Gly Arg Glu Arg Thr Val Asn Asn Gln
 900 905 910

Ser Gln Arg Cys Gly Phe Ile Ser Ser Ile Thr Gly Leu Trp Gly Ser
 915 920 925

Glu Glu Cys Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Cys Lys Arg Lys Lys Val
 930 935 940

Trp Leu Ile Glu Lys Lys Lys Asp Thr Pro Lys Gln His Gly Thr Cys
 945 950 955 960

Pro Lys Gly Trp Leu Tyr Phe Asn Tyr Lys Cys Leu Leu Leu Asn Ile
 965 970 975

Pro Lys Asp Pro Ser Ser Trp Lys Asn Trp Thr His Ala Gln His Phe
 980 985 990

Cys Ala Glu Glu Gly Gly Thr Leu Val Ala Ile Glu Ser Glu Val Glu
 995 1000 1005

Gln Ala Phe Ile Thr Met Asn Leu Phe Gly Gln Thr Thr Ser Val
 1010 1015 1020

Trp Ile Gly Leu Gln Asn Asp Asp Tyr Glu Thr Trp Leu Asn Gly
 1025 1030 1035

Lys Pro Val Val Tyr Ser Asn Trp Ser Pro Phe Asp Ile Ile Asn
 1040 1045 1050

Ile Pro Ser His Asn Thr Thr Glu Val Gln Lys His Ile Pro Leu
 1055 1060 1065

ES 2 812 542 T3

Cys Ala Leu Leu Ser Ser Asn Pro Asn Phe His Phe Thr Gly Lys
 1070 1075 1080
 Trp Tyr Phe Glu Asp Cys Gly Lys Glu Gly Tyr Gly Phe Val Cys
 1085 1090 1095
 Glu Lys Met Gln Asp Thr Ser Gly His Gly Val Asn Thr Ser Asp
 1100 1105 1110
 Met Tyr Pro Met Pro Asn Thr Leu Glu Tyr Gly Asn Arg Thr Tyr
 1115 1120 1125
 Lys Ile Ile Asn Ala Asn Met Thr Trp Tyr Ala Ala Ile Lys Thr
 1130 1135 1140
 Cys Leu Met His Lys Ala Gln Leu Val Ser Ile Thr Asp Gln Tyr
 1145 1150 1155
 His Gln Ser Phe Leu Thr Val Val Leu Asn Arg Leu Gly Tyr Ala
 1160 1165 1170
 His Trp Ile Gly Leu Phe Thr Thr Asp Asn Gly Leu Asn Phe Asp
 1175 1180 1185
 Trp Ser Asp Gly Thr Lys Ser Ser Phe Thr Phe Trp Lys Asp Glu
 1190 1195 1200
 Glu Ser Ser Leu Leu Gly Asp Cys Val Phe Ala Asp Ser Asn Gly
 1205 1210 1215
 Arg Trp His Ser Thr Ala Cys Asp Ser Phe Leu Gln Gly Ala Ile
 1220 1225 1230
 Cys His Val Pro Pro Glu Thr Arg Gln Ser Glu His Pro Glu Leu
 1235 1240 1245
 Cys Ser Glu Thr Ser Ile Pro Trp Ile Lys Phe Lys Ser Asn Cys
 1250 1255 1260
 Tyr Lys Phe Ser Thr Val Leu Asp Ser Met Ser Phe Glu Ala Ala
 1265 1270 1275
 His Glu Phe Cys Lys Lys Glu Gly Ser Asn Leu Leu Thr Ile Lys
 1280 1285 1290
 Asp Glu Ala Glu Asn Ala Phe Leu Leu Glu Glu Leu Phe Ala Phe
 1295 1300 1305
 Gly Ser Ser Val Gln Met Val Trp Leu Asn Ala Gln Phe Asp Gly
 1310 1315 1320
 Asn Ser Lys
 1325

ES 2 812 542 T3

<210> 24
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> péptido inhibidor
 <400> 24
 Leu Ser Leu Tyr Glu Cys Asp Ser Thr Leu Val Ser Leu Arg Trp Arg
 1 5 10 15
 Cys Asn Arg Lys Met Ile Thr Gly Pro Leu Gln Tyr Ser Val Gln Val
 20 25 30
 Ala His Asp Asn Thr Val Val Ala Ser Arg Lys Tyr Ile His Lys Trp
 35 40 45
 10
 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> péptido inhibidor
 20
 <400> 25
 Trp Glu Lys Asp Leu Asn Ser His Ile Cys Tyr Gln Phe Asn Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser
 <210> 26
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> péptido inhibidor
 30
 <400> 26
 Asp Cys Glu Ser Thr Leu Pro Tyr Ile Cys Lys Lys Tyr Leu Asn His
 1 5 10 15
 Ile Asp His Glu Ile Val Glu Lys
 20
 35
 <210> 27
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> péptido inhibidor
 <400> 27
 Gln Tyr Lys Val Gln Val Lys Ser Asp Asn Thr Val Val Ala Arg Lys
 1 5 10 15
 Gln Ile His Arg Trp Ile Ala Tyr Thr Ser Ser Gly Gly Asp Ile Cys
 20 25 30
 45 Glu

ES 2 812 542 T3

<210> 28
 <211> 28
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido inhibidor

 10 <400> 28
 Leu Ser Tyr Leu Asn Trp Ser Gln Glu Ile Thr Pro Gly Pro Phe Val
 1 5 10 15

 Glu His His Cys Gly Thr Leu Glu Val Val Ser Ala
 20 25

 <210> 29
 <211> 23
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido inhibidor
 20

 <400> 29
 Ser Arg Phe Glu Gln Ala Phe Ile Thr Ser Leu Ile Ser Ser Val Ala
 1 5 10 15

 Glu Lys Asp Ser Tyr Phe Trp
 20

 <210> 30
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> péptido inhibidor

 <400> 30
 Trp Ile Cys Arg Ile Pro Arg Asp Val Arg Pro Lys Phe Pro Asp Trp
 1 5 10 15

 Tyr Gln Tyr Asp Ala Pro Trp Leu Phe Tyr Gln Asn Ala
 20 25

 35 <210> 31
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> péptido inhibidor

 <400> 31
 Ala Phe His Gln Ala Phe Leu Thr Val Leu Leu Ser Arg Leu Gly His
 1 5 10 15

 Thr His Trp Ile Gly Leu Ser Thr Thr Asp Asn Gly Gln Thr
 20 25 30
 45

REIVINDICACIONES

- 1.- Un compuesto para su uso en un método para tratar una inmunodeficiencia de células T CD4 en un sujeto que lo necesita, en el que el compuesto es un inhibidor de la fosfolipasa A2 del grupo IB segregada (PLA2GIB) seleccionada de un anticuerpo anti-PLA2GIB o un receptor de PLA2GIB soluble, en el que la PLA2GIB es una proteína que comprende los restos aminoácidos 23-148 de SEQ ID NO:2, o uno de sus variantes naturales.
- 2.- El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de PLA2GIB se selecciona de anticuerpos policlonales anti-PLA2GIB, anticuerpos monoclonales anti-PLA2GIB, y sus fragmentos que se unen a PLA2GIB seleccionados de fragmentos F(ab')₂ y Fab, fragmentos variables monocatenarios (scFv), fragmentos de anticuerpo de dominio único VHH, y fragmentos de anticuerpos de diacuerpos bivalentes.
- 3.- El compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 4.- El compuesto para su uso según la reivindicación 2 o 3, en el que el anticuerpo es humano o está humanizado.
- 5.- El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para tratar una inmunodeficiencia provocada por una infección vírica o bacteriana.
- 6.- El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para tratar una inmunodeficiencia provocada por un cáncer.
- 7.- El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en un método para tratar el SIDA en un sujeto infectado por VIH.
- 8.- El compuesto para su uso según la reivindicación 7, para suprimir o revertir la inmunodeficiencia mediada por VIH.
- 9.- El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto se administra mediante inyección, preferiblemente intramuscular, subcutánea, transdérmica, intravenosa o intraarterial; mediante administración nasal, oral, mucósica o rectal, o mediante inhalación.
- 10.- Una composición farmacéutica que comprende, en forma de una disolución inyectable o una suspensión inyectable, (i) un anticuerpo inhibidor contra la fosfolipasa A2 del grupo IB segregada (PLA2GIB) seleccionado de anticuerpos policlonales anti-PLA2GIB, anticuerpos monoclonales anti-PLA2GIB, y sus fragmentos que se unen a PLA2GIB seleccionados de fragmentos F(ab')₂ y Fab, fragmentos variables monocatenarios (scFv), fragmentos de anticuerpo de dominio único (VHH o nanocuerpos), y fragmentos de anticuerpos bivalentes (diacuerpos), y (ii) un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para una disolución inyectable o una suspensión inyectable, y en la que la PLA2GIB es una proteína que comprende los restos aminoácidos 23-148 de SEQ ID NO:2, o uno de sus variantes naturales.
- 11.- La composición de la reivindicación 10, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 12.- La composición de la reivindicación 10 u 11, en el que el anticuerpo es humano o está humanizado.
- 13.- Una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar una inmunodeficiencia de células T CD4 en un sujeto que lo necesita, que comprende (i) un anticuerpo inhibidor contra la fosfolipasa A2 del grupo IB segregada (PLA2GIB) seleccionado de anticuerpos policlonales anti-PLA2GIB, anticuerpos monoclonales anti-PLA2GIB, y sus fragmentos que se unen a PLA2GIB seleccionados de fragmentos F(ab')₂ y Fab, fragmentos variables monocatenarios (scFv), fragmentos de anticuerpo de dominio único (VHH o nanocuerpos), y fragmentos de anticuerpos bivalentes (diacuerpos), y (ii) un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y en la que la PLA2GIB es una proteína que comprende los restos aminoácidos 23-148 de SEQ ID NO:2, o uno de sus variantes naturales.

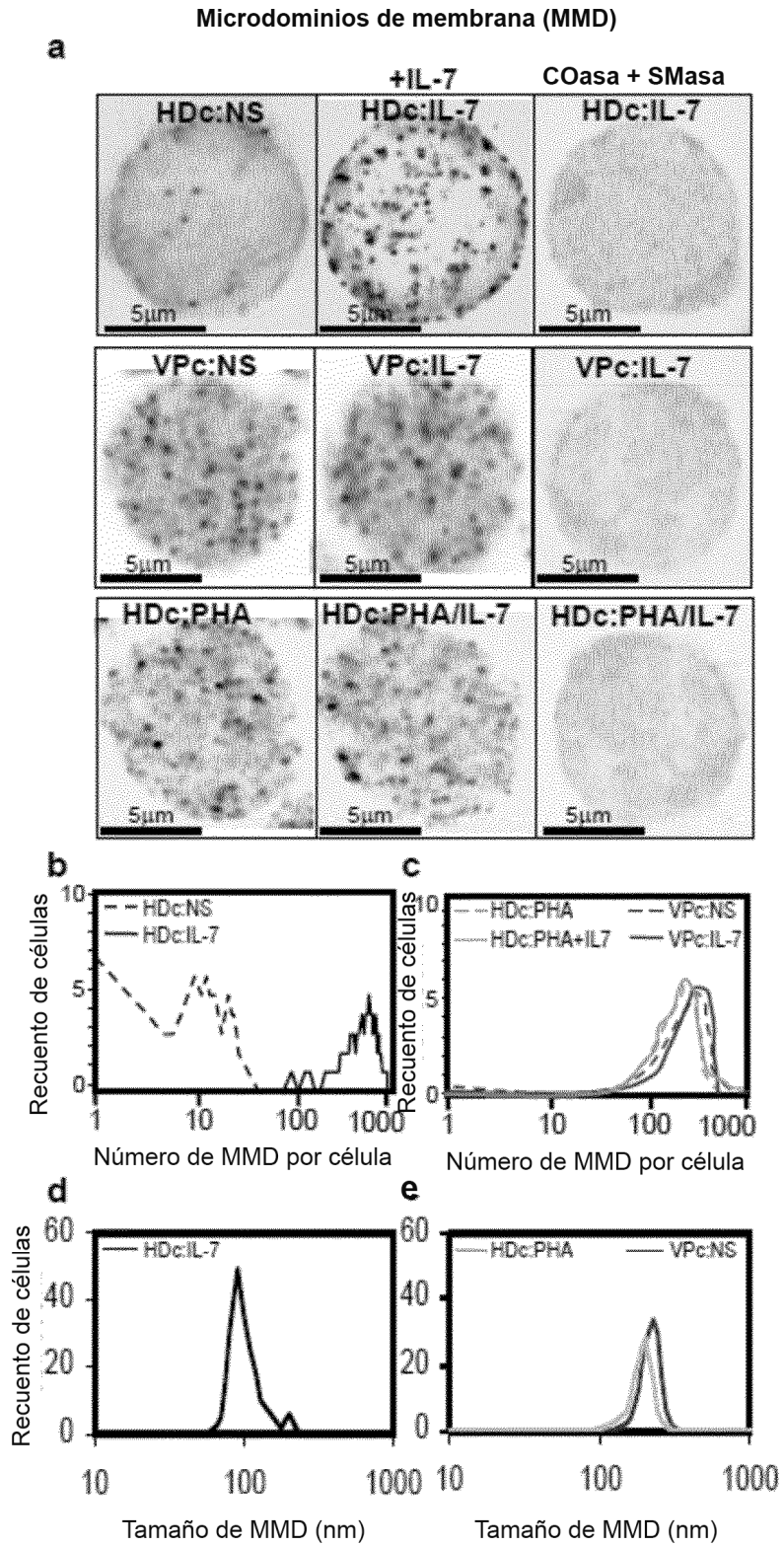


FIGURA 1

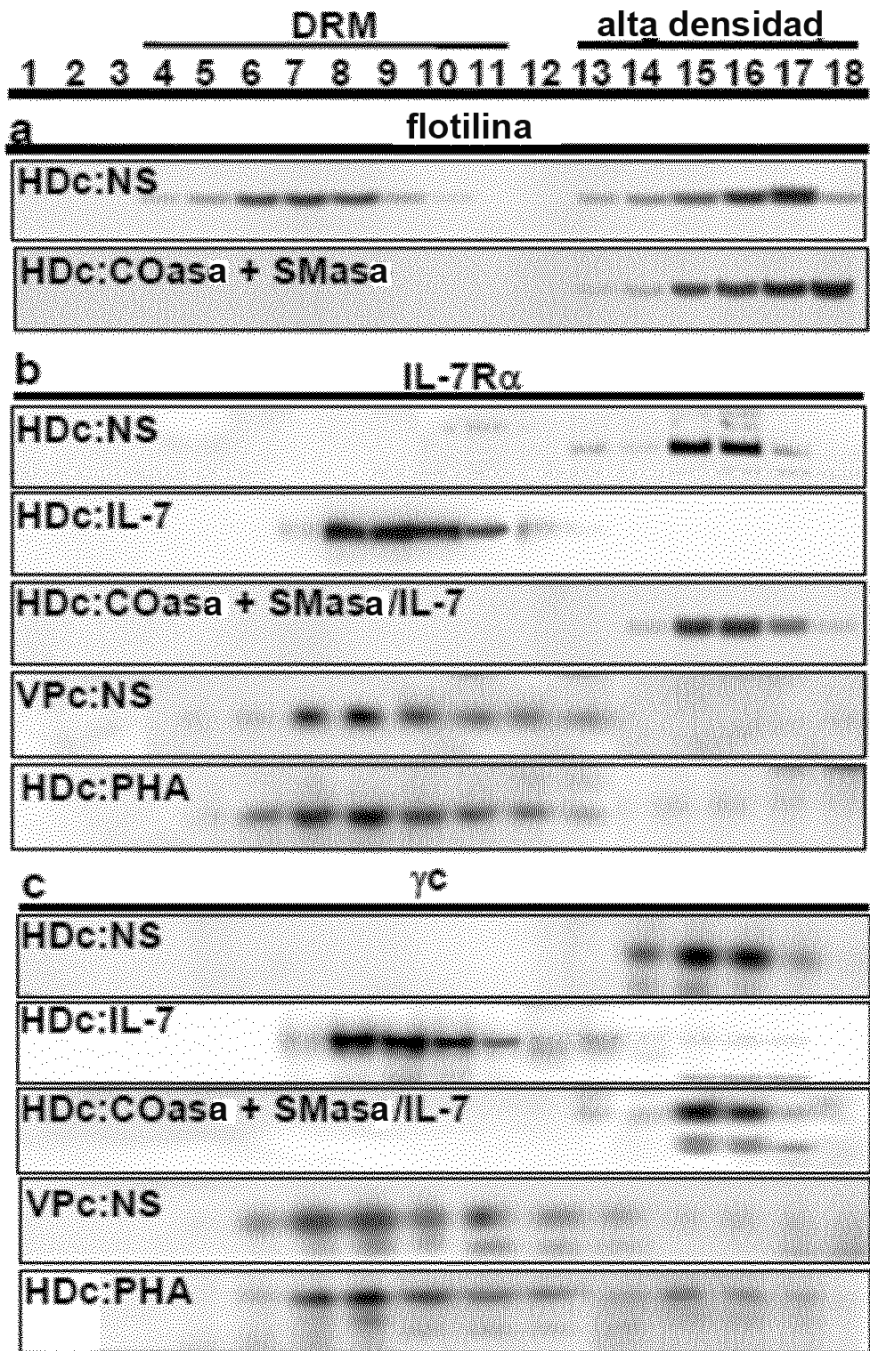


FIGURA 2

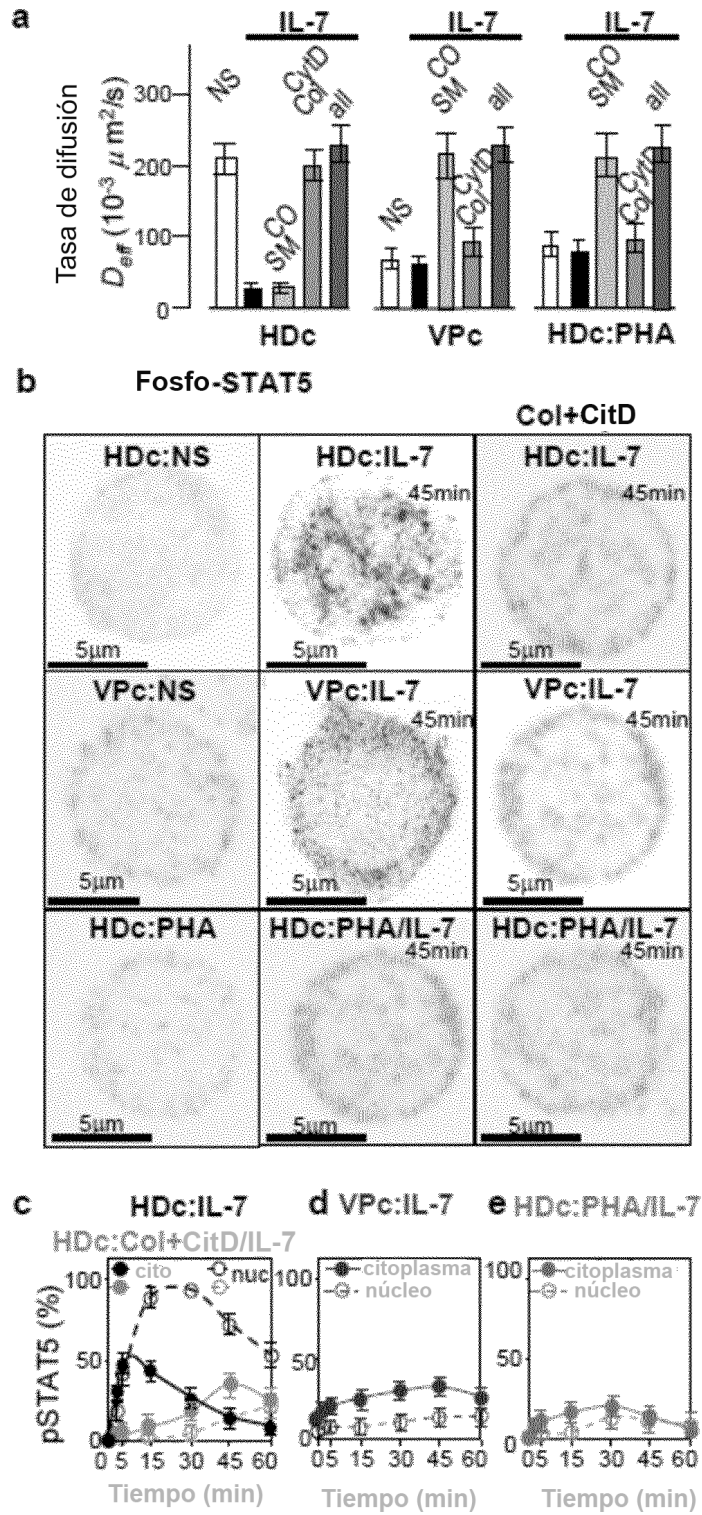


FIGURA 3

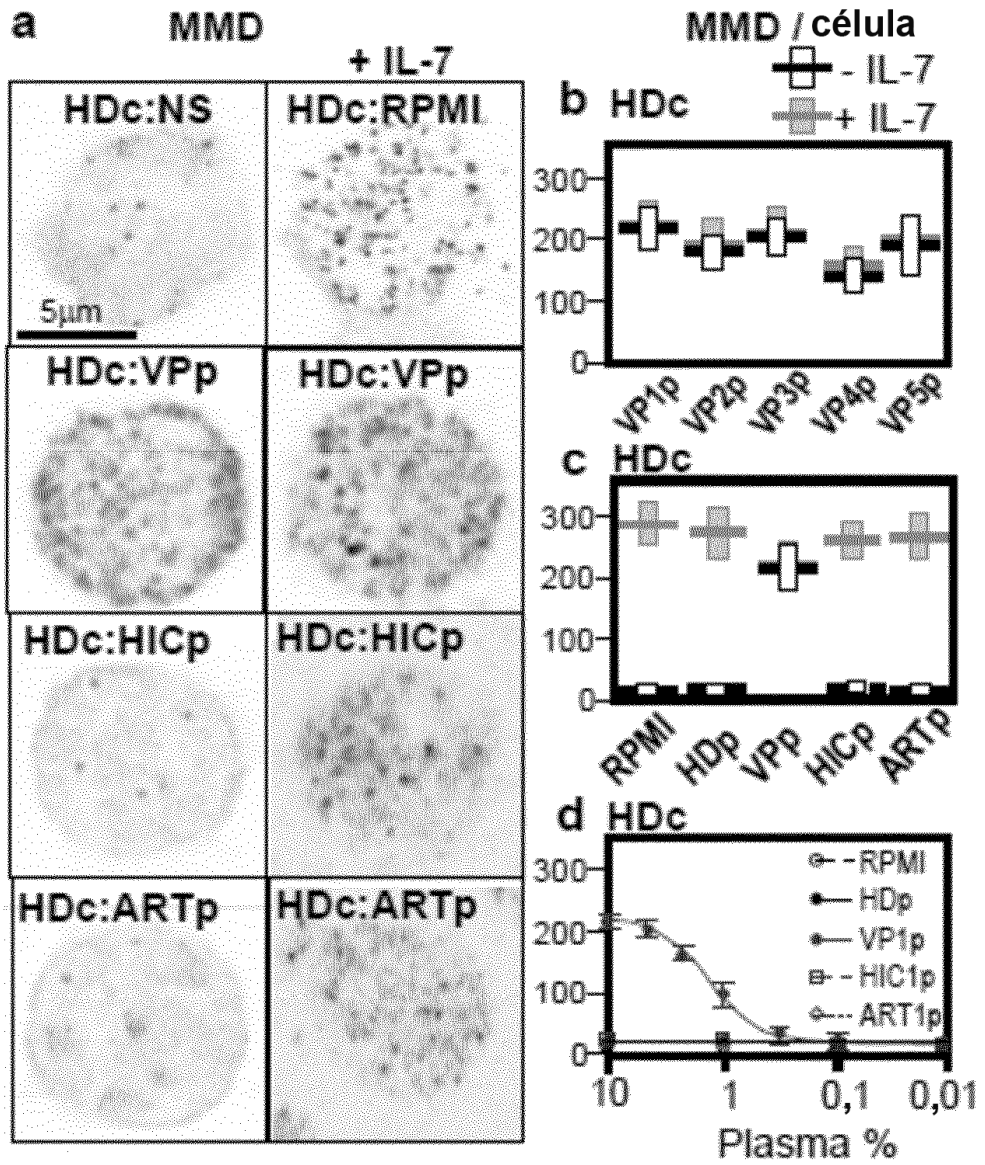


FIGURA 4

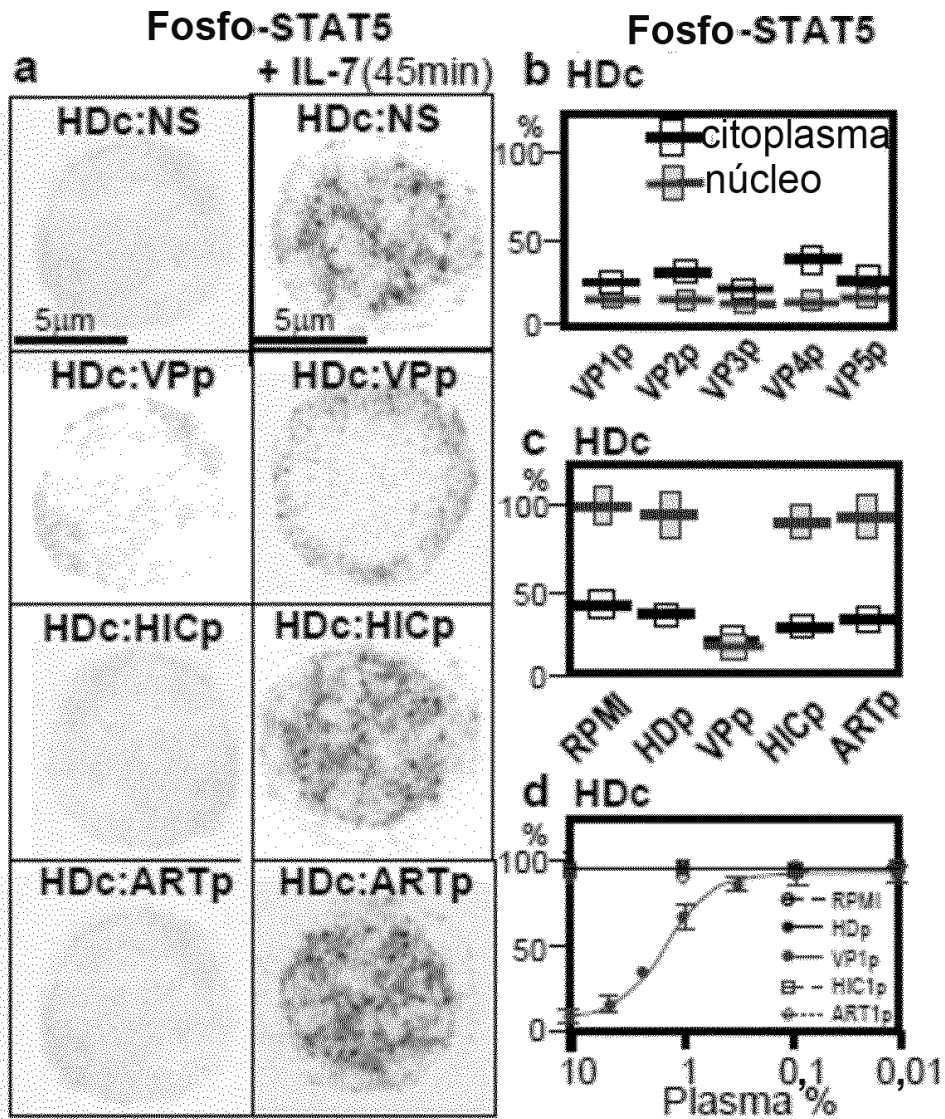


FIGURA 5

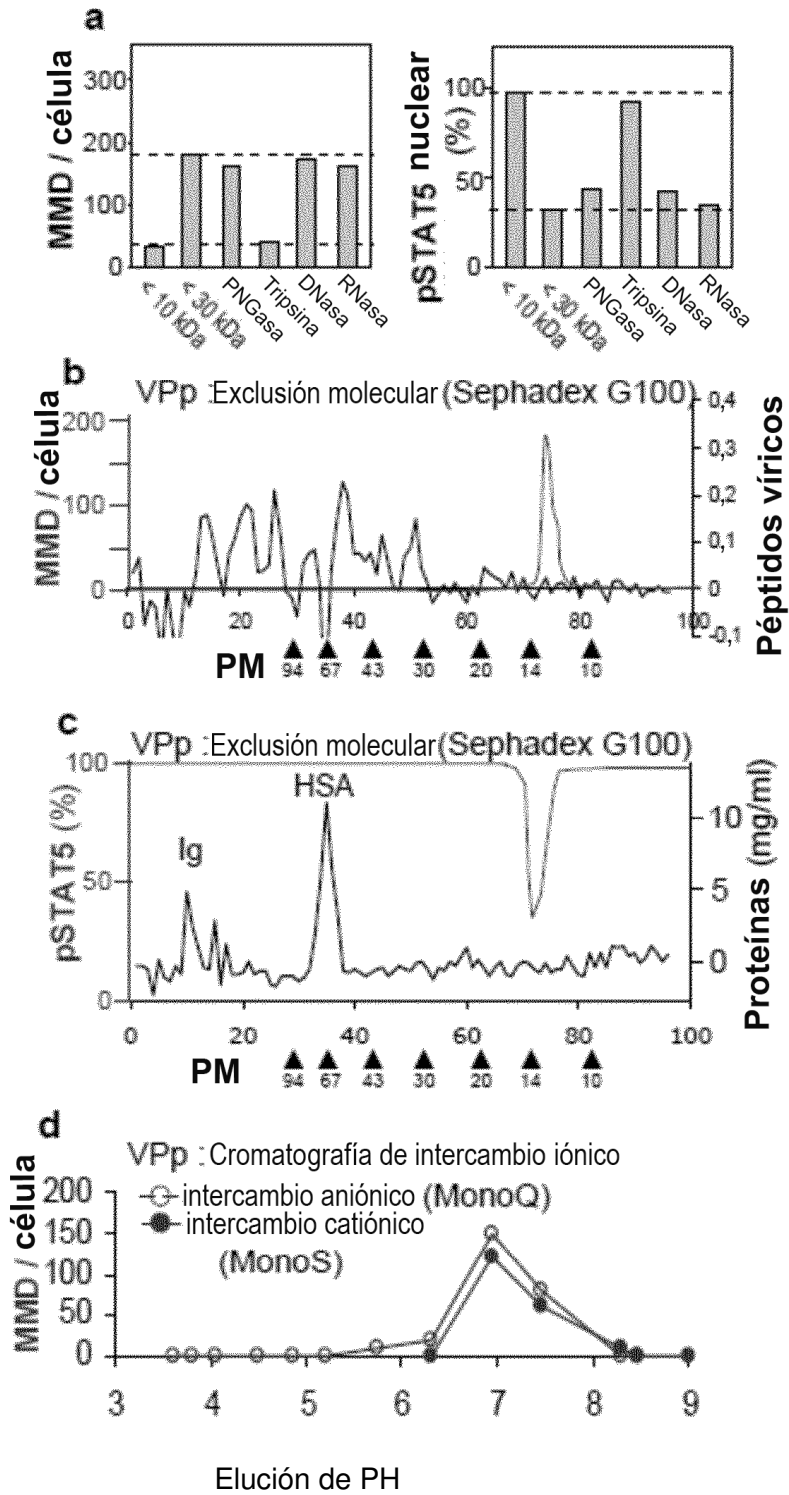


FIGURA 6

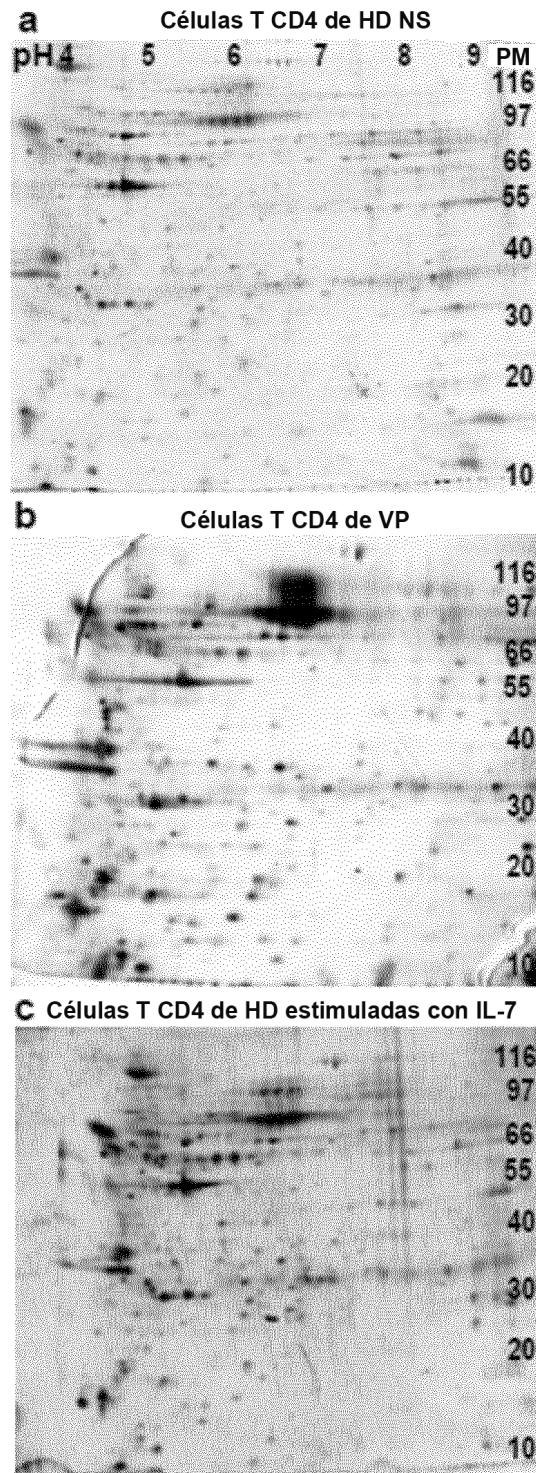


FIGURA 7

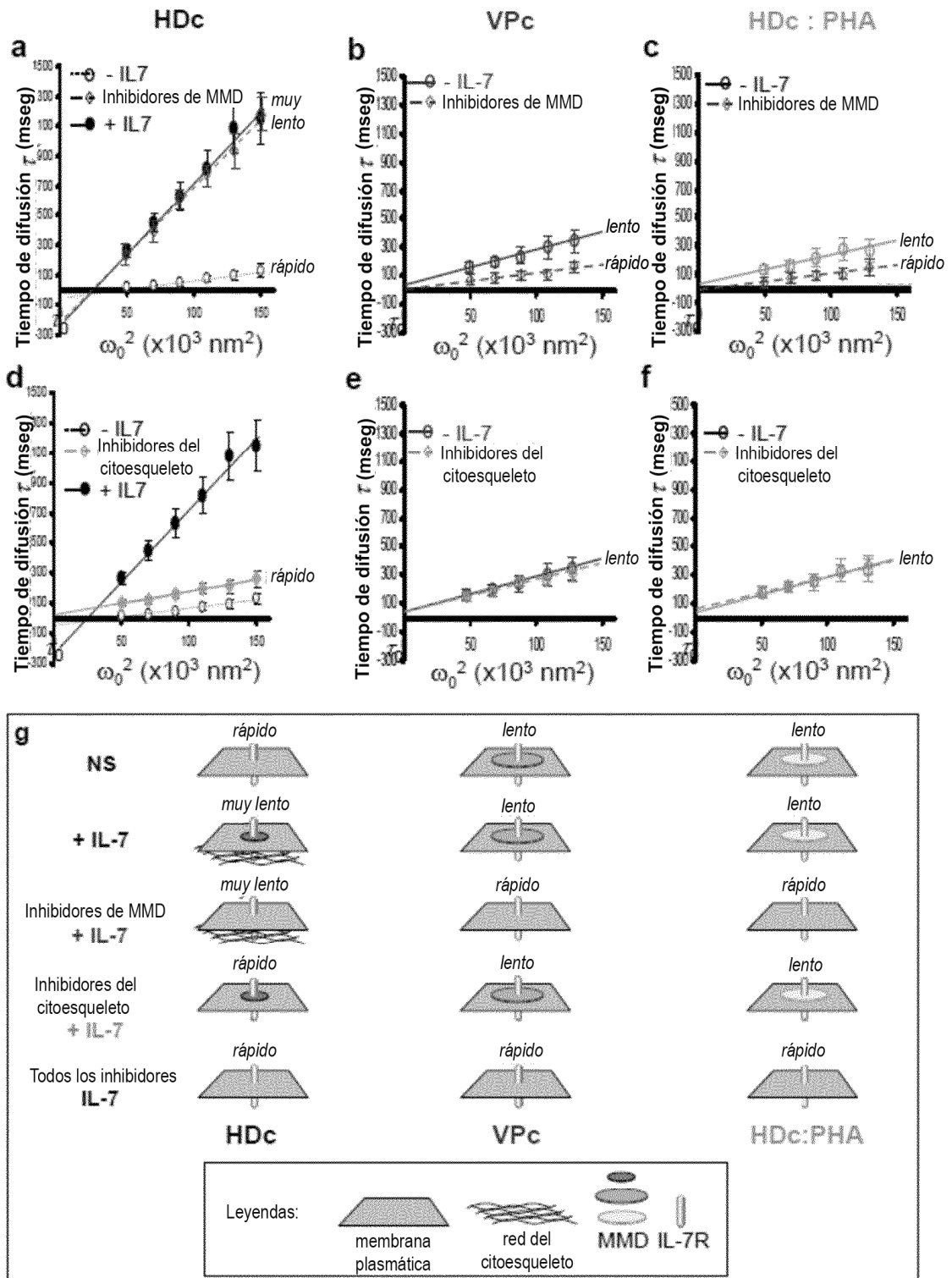


FIGURA 8

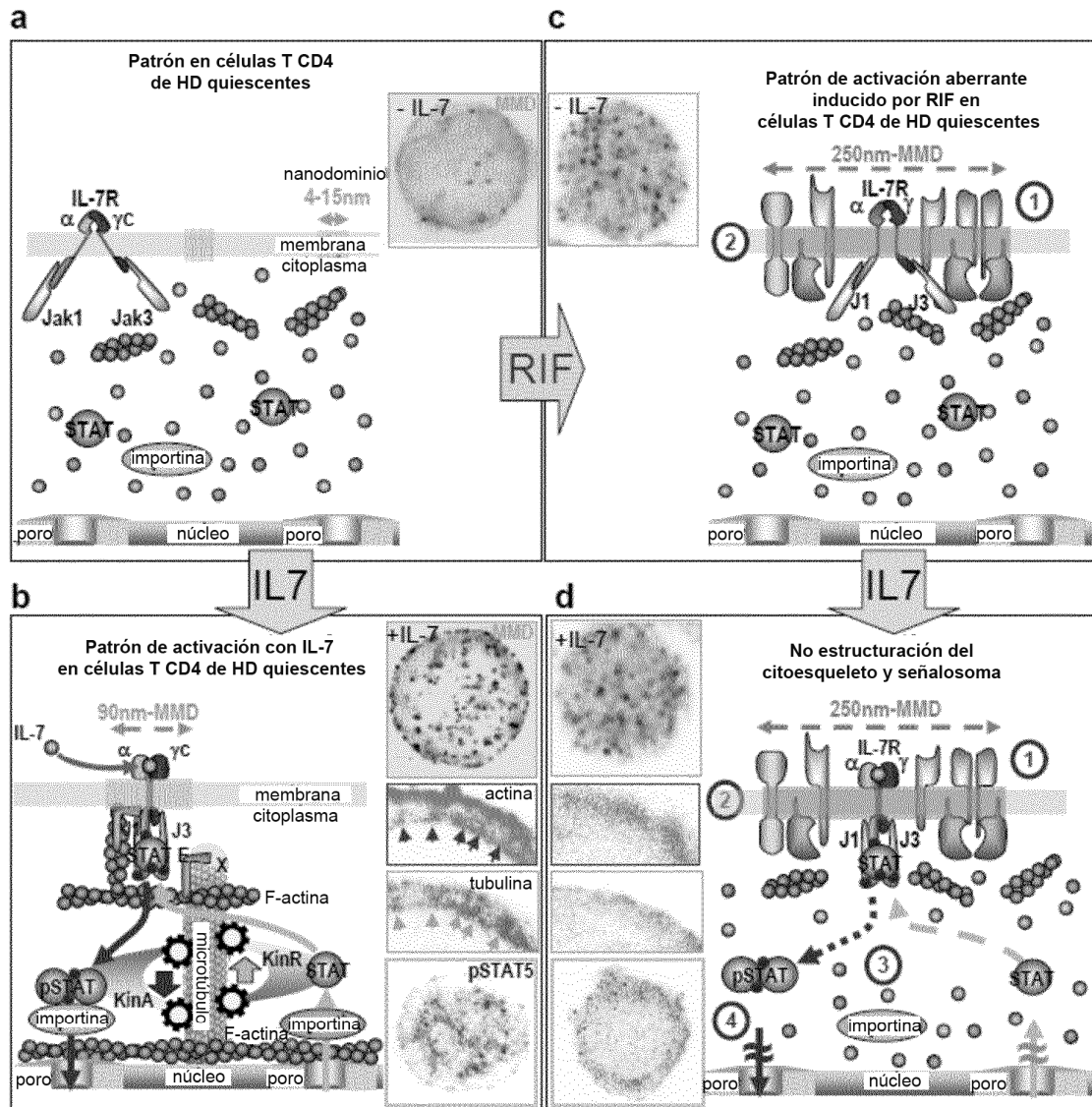
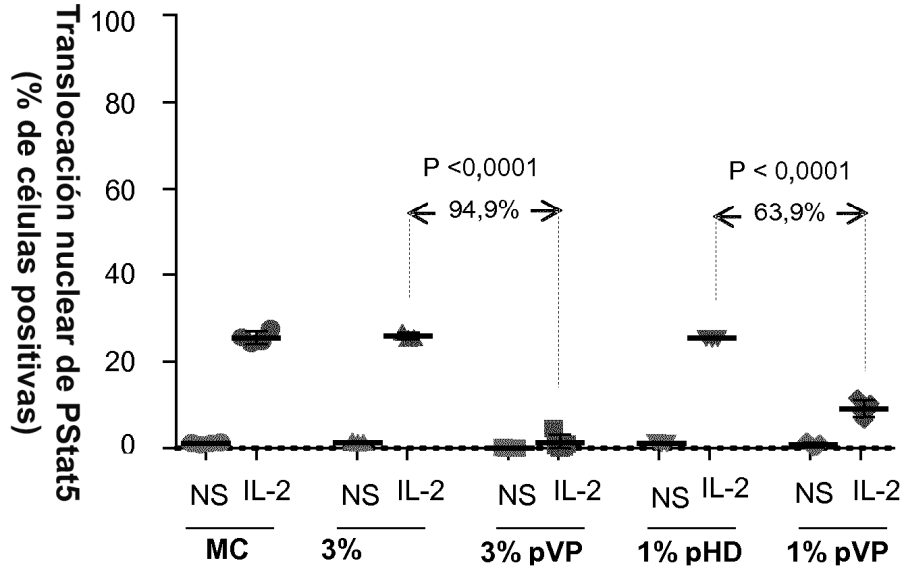


FIGURA 9

a. Células T CD4 totales



b. Células T CD4+ CD25+

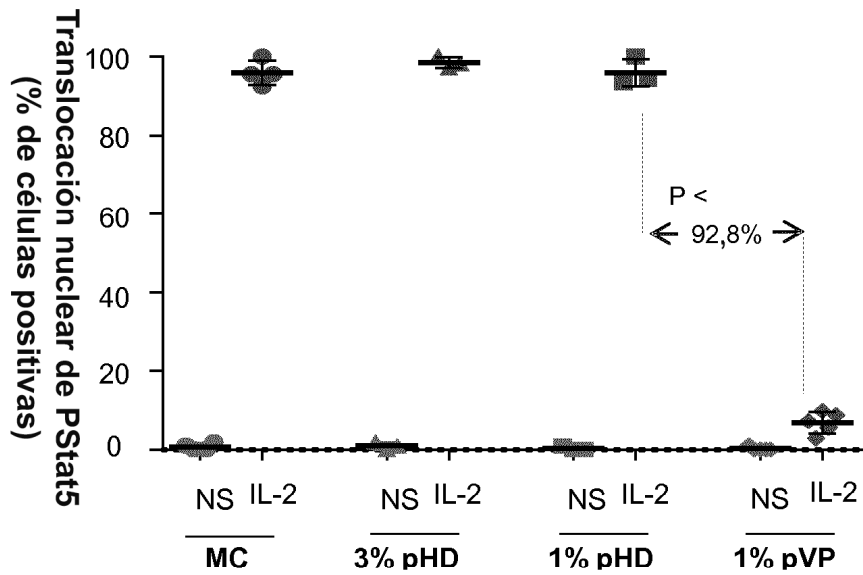


FIGURA 10

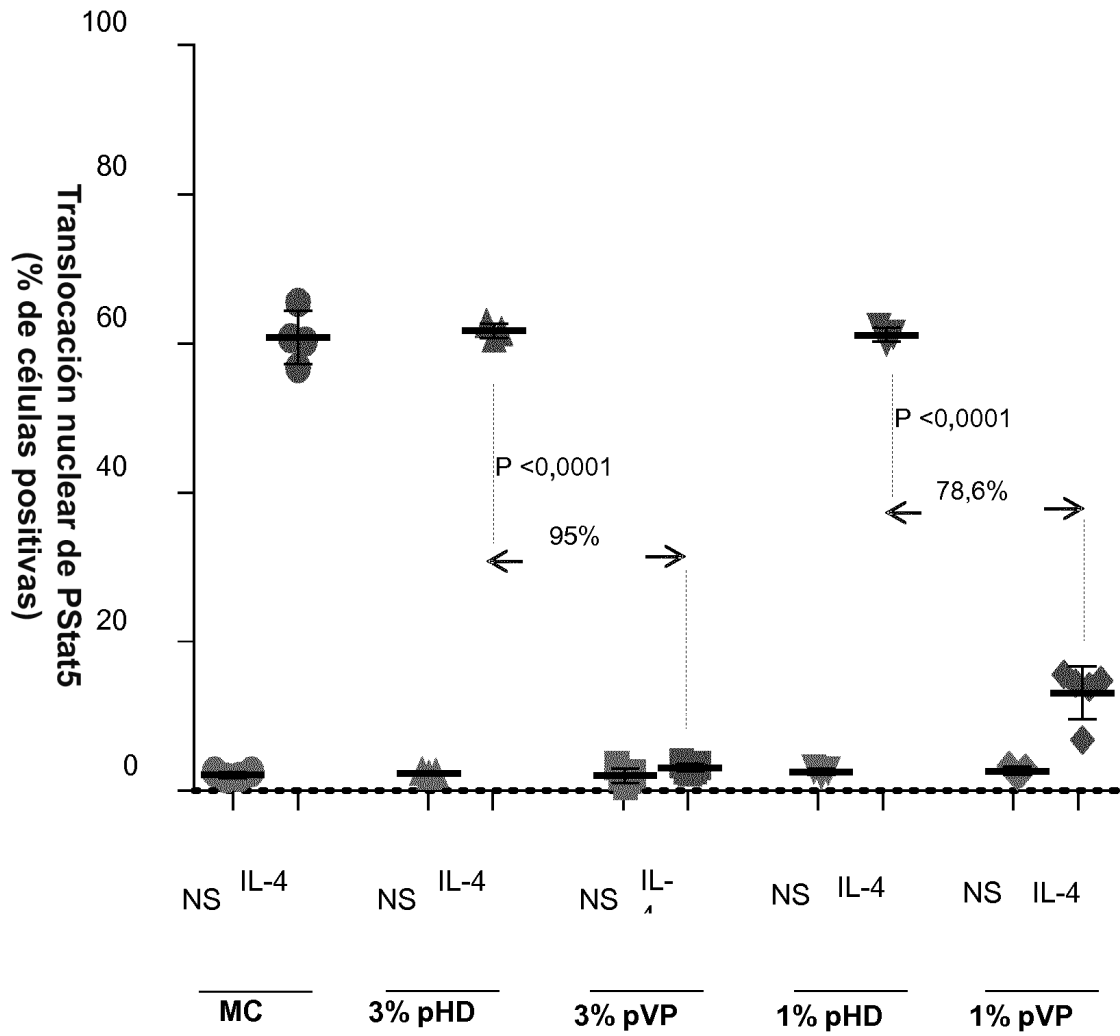


FIGURA 11

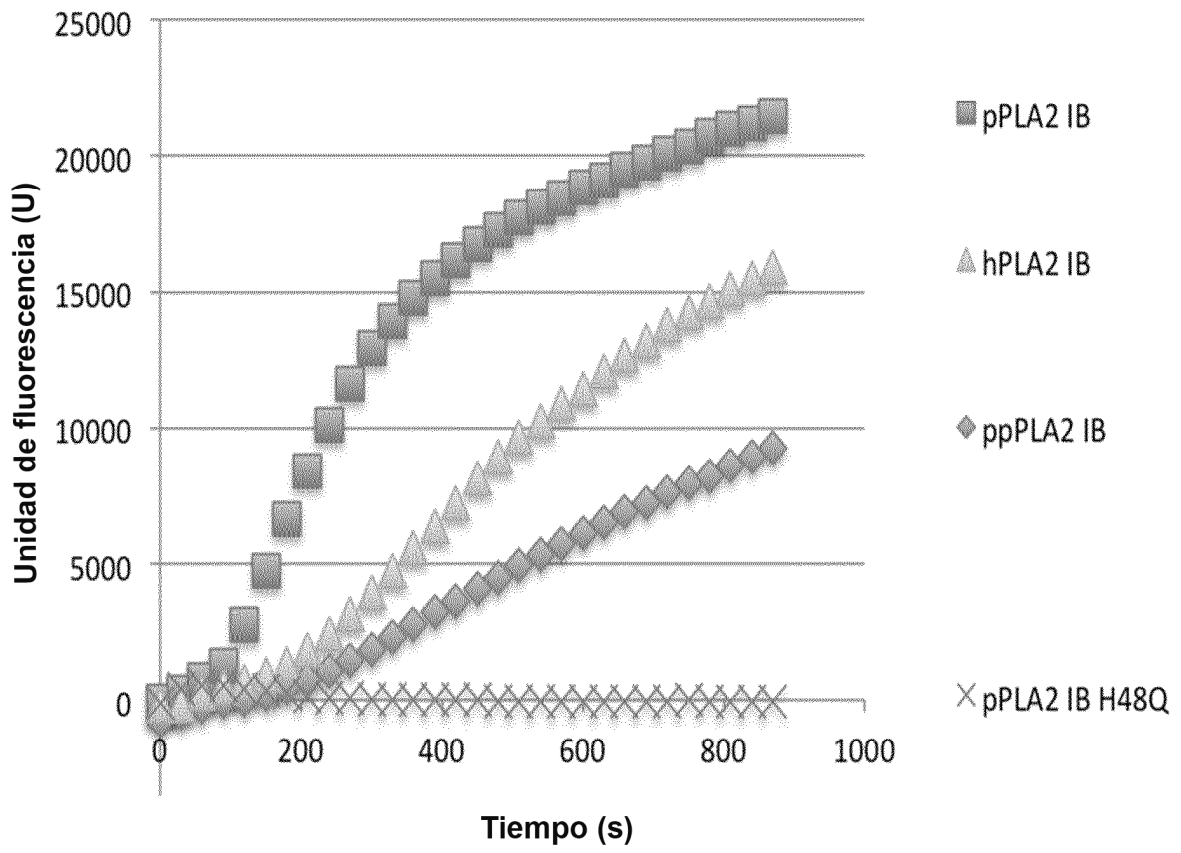
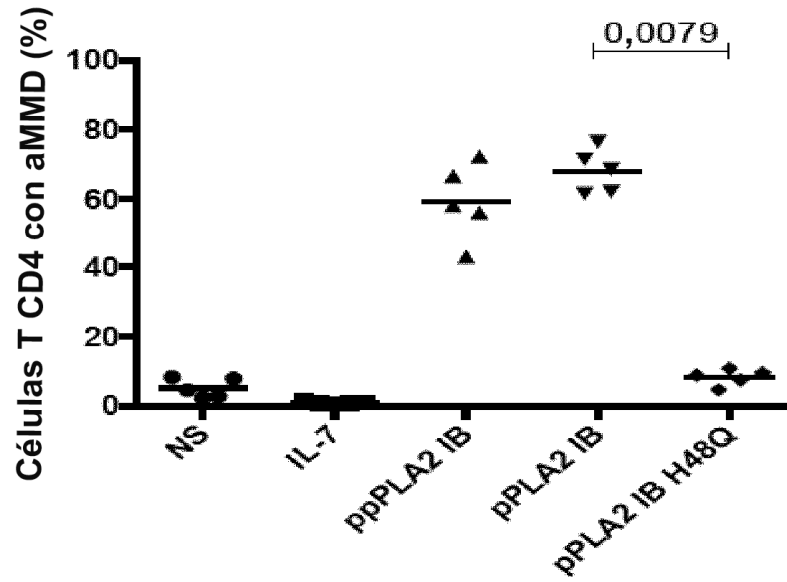


FIGURA 12

A



B

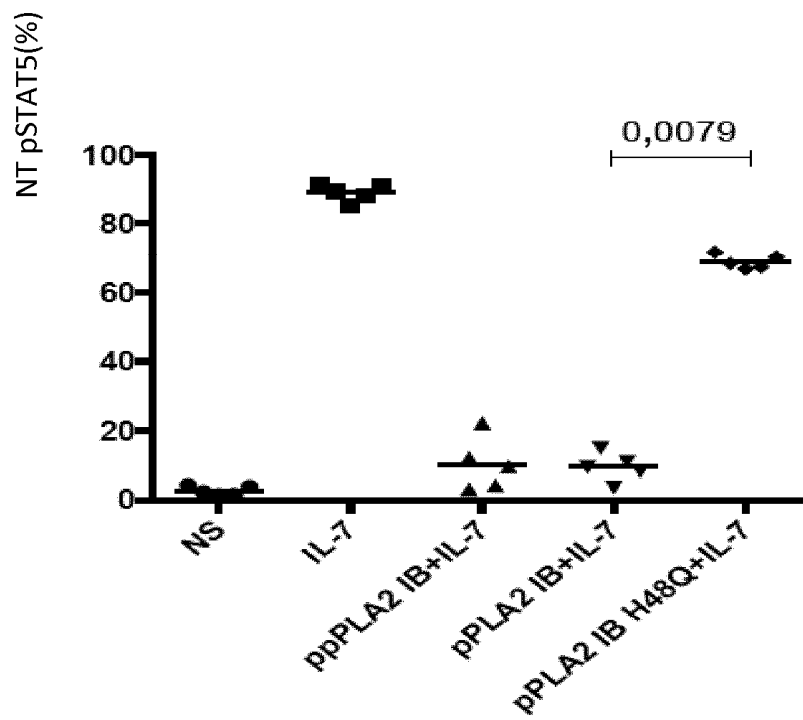
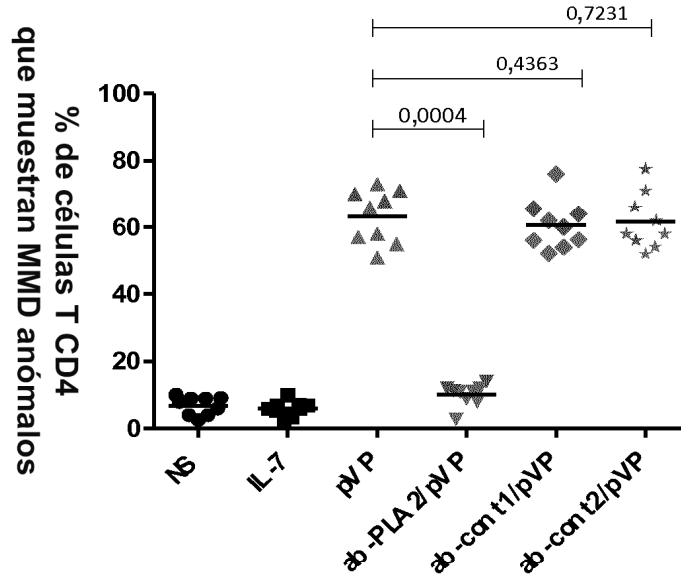


FIGURA 13

a.



b.

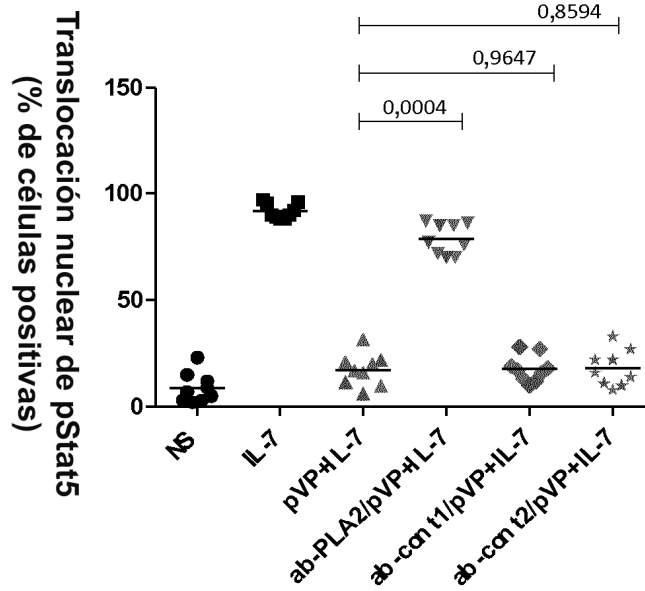


FIGURA 14

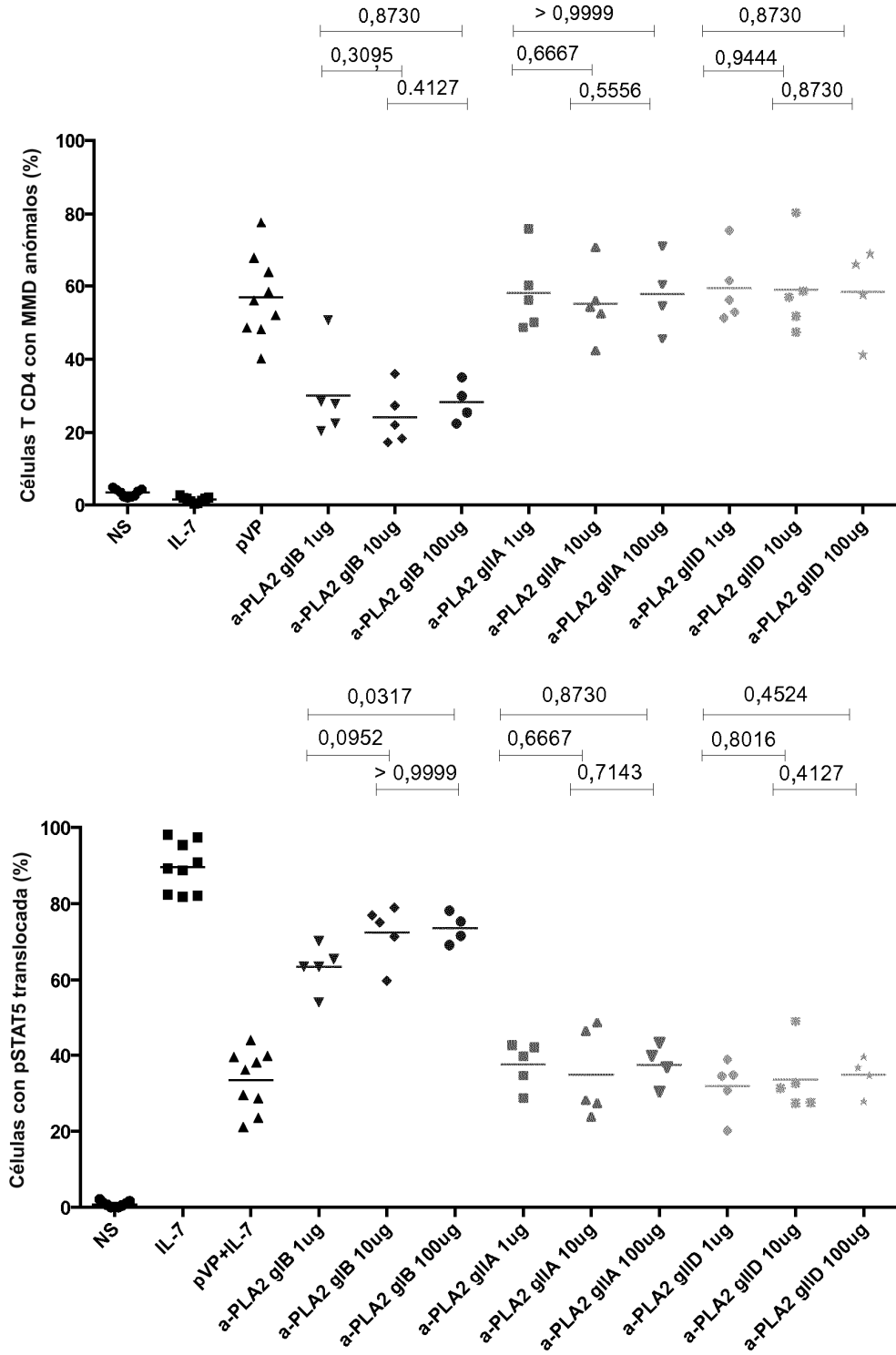


FIGURA 15

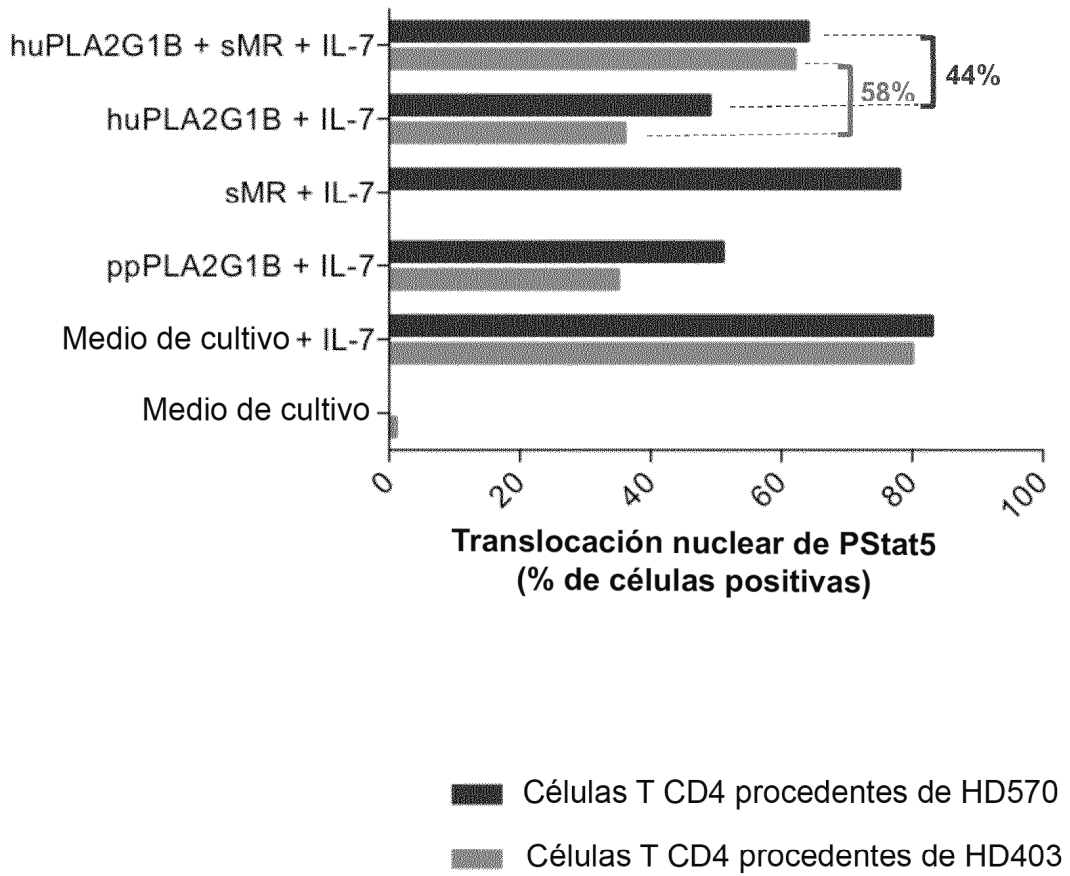
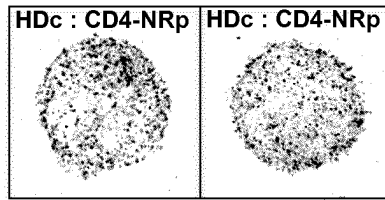


FIGURA 16

a. **MMD**
+ IL-7



b.

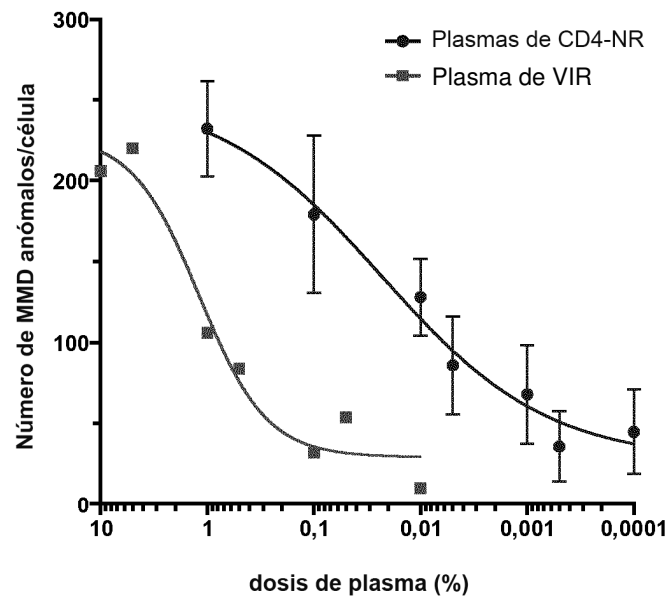


FIGURA 17