

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040303**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.05.18**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/40** (2006.01)  
**C12N 9/20** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201691314**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.12.22**

---

**(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ, ГДЕ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ ИНГИБИТОРЫ GIBSPLA2, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ИММУНОДЕФИЦИТОМ CD4 Т-КЛЕТОК, И КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ПОДОБНЫЕ ИНГИБИТОРЫ GIBSPLA2**

---

**(31)** 61/920,137; 62/017,457; 14174599.2

**(32)** 2013.12.23; 2014.06.26; 2014.06.26

**(33)** US; US; EP

**(43)** 2016.11.30

**(86)** PCT/EP2014/078969

**(87)** WO 2015/097140 2015.07.02

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЭНСТИТЮ ПАСТЁР (FR)**

**(72)** Изобретатель:  
**Тез Жак, Роз Тьерри, Бюго Флоранс (FR)**

**(74)** Представитель:  
**Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)**

**(56)** SEILHAMER J J ET AL.: "PANCREATIC PHOSPHOLIPASE A2: ISOLATION OF THE HUMAN GENE AND CDNAS FROM PORCINE PANCREAS AND HUMAN LUNG", DNA, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 5, no. 6, 1 December 1986 (1986-12-01), pages 519-527, XP009003085, ISSN: 0198-0238 the whole document  
W. XU ET AL.: "Structural Insight into the Activation Mechanism of Human Pancreatic Phospholipase A2", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 24, 18 March 2009 (2009-03-18), pages 16659-16666, XP055136013, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M808029200 abstract Experimental Procedures: Expression and Purification of Pro-hG1B  
LIMOU ET AL.: "Exploration of associations between phospholipase A2 gene family polymorphisms and AIDS progression using the SNPlex(TM) method", BIOMEDICINE AND PHARMACOTHERAPY, ELSEVIER, FR, vol. 62, no. 1, 3 December 2007 (2007-12-03), pages 31-40, XP022418148, ISSN: 0753-3322 abstract Results  
WO-A2-2004002295

---

**(57)** Предложены способы лечения иммунных нарушений у субъекта, которые основаны на детекции или модуляции фактора, индуцирующего резистентное состояние (RIF). Более конкретно настоящее изобретение относится к использованию ингибитора секретируемой фосфолипазы A2 группы IB (GIBsPLA2) для лечения заболевания, связанного с иммунодефицитом CD4 Т-клеток, у субъекта.

**B1**

**040303**

**040303 B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям и способам для модуляции иммунной системы у субъекта, нуждающегося в этом. В частности, в изобретении раскрыто наличие ключевого эндогенного фактора иммунного ответа и дана его характеристика, и предлагаются новые терапевтические и диагностические способы и композиции на основе модуляции этого фактора. В частности, изобретение обеспечивает композиции и способы, пригодные для стимуляции или ингибирования иммунного ответа, опосредованного CD4 Т-клетками, у субъекта, а также способы и композиции для мониторинга иммунодефицита, включая иммунодефицит, связанный с инфекцией вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Также предлагаются способы и композиции для диагностики и анализа дефектов CD4 Т-клеток, оставшиеся после антиретровирусной терапии, а также способы разработки лекарственных средств, способных специфически лечить этот иммунодефицит.

### Введение

CD4 Т-лимфоциты играют исключительную роль в контроле иммунной системы (как клеточного, так и гуморального ответа) и являются критическими при различных патологических состояниях.

При иммунологическом заболевании, связанном с патогенезом ВИЧ, менее 0,5% CD4 Т-клеток являются действительно инфицированными (по результатам измерения в периферической крови), но основное большинство CD4 Т-клеток демонстрируют значительную регуляторную дисфункцию. Неинфицированные CD4 Т-лимфоциты теряют свою функцию нарастающим образом, становятся анергичными, и их число снижается, приводя к CD4-лимфопении. Анергия и лимфопения являются ключевыми характеристиками иммунодефицита, характерного для ВИЧ-инфицированных пациентов. Механизмы, лежащие в основе этого феномена, никогда не были полностью объяснены (1).

Иммунная активация и воспаление также играют критическую роль в патогенезе ВИЧ (2, 3). Авторы изобретения ранее показали, что снижение способности к ответу на интерлейкин-2 (IL-2), приводящее к CD4 анергии (4), и снижение способности к ответу на интерлейкин-7 (IL-7) при разрыве IL-7/CD4 регуляторной петли участвует в механизме, приводящем к CD4 лимфопении (5). Вовлеченные механизмы связаны с дефектами пути Янус-киназы/переносчика сигнала и активатора транскрипции (STAT) (6, 7). Подобные результаты были получены другими лабораториями (8, 9). В связи с этим компартиментализация рецептора IL-7 (IL-7R) необходима для инициации нормального CD4 Т-клеточного ответа (10). При связывании IL-7 две цепи IL-7R (IL-7R альфа и гамма-с) вначале направляются в мембранные микродомены (ММД). Имеются клеточные компартменты, которые, как липидные рафты, богаты холестерином и сфингомиелином, но они также содержат значительные количества структурных и функциональных белков (11). Комплексы IL-7R индуцируют реорганизацию цитоскелета, который затем взаимодействует с их сетями. Эти два последовательных этапа необходимы для инициации пути Jak/STAT (12).

Авторы настоящего изобретения исследовали механизмы, лежащие в основе неспособности к ответу CD4 Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусемией (ВП). Проведенные эксперименты продемонстрировали, что хроническая активация CD4 Т-лимфоцитов приводит их в aberrантное состояние активации/дифференцировки, которое делает их невосприимчивыми к определенным физиологическим сигналам, таким как те, которые обеспечивает интерлейкин-7. Далее настоящее изобретение описывает идентификацию, выделение из плазмы человека и характеристику белка, ответственного за это aberrантное состояние активации CD4 Т-клеток. Таким образом, прежде всего настоящее изобретение раскрывает, что иммуносупрессия может быть опосредована эндогенным циркулирующим белком, который при экспрессии способен к индукции повреждения и инактивации CD4 Т-клеток, а при ингибировании может стимулировать иммунную систему субъекта.

Основываясь отчасти на этих значительных наблюдениях, в изобретении предлагаются новые способы, композиции и соединения для модуляции иммунной системы, в частности для модуляции иммунной системы у субъектов с нарушенным иммунитетом (например, с подавлением иммунитета или патологическими иммунными реакциями). Изобретение также обеспечивает новые способы лечения иммунных нарушений путем модуляции CD4 Т-клеток. В частности, изобретение пригодно для лечения иммунодефицитов, связанных с CD4 Т-клеточными нарушениями, такими как синдром иммунодефицита, связанный с ВИЧ-инфекцией. Изобретение также обеспечивает реагенты и способы для характеристики aberrантного состояния активации, реактивности на IL-7 и/или для мониторинга иммунного ответа, нарушенного у ВИЧ-инфицированных пациентов. Может быть оценен ответ CD4 Т-клеток у не получавших лечение или у получавших лечение антиретровирусными средствами пациентов, и квалифицирован их ответ на лечение, и оценена компетентность их CD4 Т-клеток.

### Изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к применению ингибитора секретируемой фосфолипазы A2 группы IB (GIBsPLA2) для лечения заболевания, связанного с иммунодефицитом CD4 Т-клеток, у субъекта, нуждающегося в этом. Ингибитор GIBsPLA2 выбирают из группы, состоящей из анти-GIBsPLA2 антитела, молекулы ингибирующей нуклеиновой кислоты, основанной на последовательности гена GIBsPLA2, растворимого рецептора GIBsPLA2 и пептида, содержащего от 3 до 20 аминокислотных остатков, где указанный пептид получают способом, включающим (i) приведение в контакт тестируемого пептида с GIBsPLA2, (ii) выбор тестируемого пептида, который связывает GIBsPLA2, и (iii) выбор того пептида

из (ii) который ингибирует активность GIBsPLA2.

Белок GIBsPLA2 может содержать аминокислотные остатки 23-148 последовательности SEQ ID NO: 2 или ее природного варианта.

В том случае, когда ингибитором GIBsPLA2 является антитело к GIBsPLA2, оно может быть выбрано из анти-GIBsPLA2 поликлонального антитела, анти-GIBsPLA2 моноклонального антитела, или GIBsPLA2-связывающих фрагментов, выбранных из F(ab')<sub>2</sub> фрагментов, Fab фрагментов, одноцепочечных переменных фрагментов (scFvs), однодоменных антител (VHH или нанотел), двухвалентных фрагментов антител (диател). Данное антитело также может быть человеческим или гуманизированным.

В свою очередь, когда ингибитором GIBsPLA2 является ингибирующая нуклеиновая кислота, основанная на последовательности гена GIBsPLA2, она может быть выбрана из антисмысловой нуклеиновой кислоты, малой интерферирующей РНК, малой шпилечной РНК, микроРНК, аптамеров или рибозимов, которые ингибируют ген GIBsPLA2 или экспрессию белка GIBsPLA2.

Ингибитор GIBsPLA2 может использоваться для индукции активации CD4 Т-клеток у субъекта.

У субъекта, который нуждается в подобном лечении, может отмечаться иммунодефицит или иммунодепрессия, инфекционное заболевание, такое как вирусная инфекция, или субъект болен раком. В частности, данное изобретение будет полезно для лечения СПИД у ВИЧ-инфицированного субъекта. Например, оно может использоваться для подавления или реверсирования ВИЧ-опосредованного иммунодефицита.

Ингибитор GIBsPLA2 может вводиться посредством инъекции, предпочтительно внутримышечной, подкожной, трансдермальной, внутривенной или внутриартериальной инъекции; или посредством назального, перорального, мукозального, ректального введения, или путем ингаляции.

Другой объект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции в форме раствора для инъекций или суспензии для инъекций для лечения заболевания, связанного с иммунодефицитом CD4 Т-клеток, у субъекта, нуждающегося в этом. Данная композиция включает (i) ингибитор GIBsPLA2 и (ii) фармацевтически пригодный носитель или вспомогательное вещество, подходящие для раствора для инъекций или суспензии для инъекций, Ингибитор GIBsPLA2 в данной композиции представлен анти-GIBsPLA2 антителом, выбранным из анти-GIBsPLA2 поликлонального антитела, анти-GIBsPLA2 моноклонального антитела, или их GIBsPLA2-связывающих фрагментов, выбранных из F(ab')<sub>2</sub> фрагментов, Fab фрагментов, одноцепочечных переменных фрагментов (scFvs), однодоменных антител (VHH или нанотел), двухвалентных фрагментов антител (диател). При этом GIBsPLA2 является белком, содержащим аминокислотные остатки 23-148 из SEQ ID NO: 2 или ее природного варианта.

В другом аспекте изобретения предлагается способ лечения заболевания, связанного с иммунодефицитом CD4 Т-клеток, у субъекта, нуждающегося в этом. Данный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества ингибитора GIBsPLA2, выбранного из группы, включающей анти-GIBsPLA2 антитело, ингибирующую нуклеиновую кислоту, основанную на последовательности гена GIBsPLA2, растворимого рецептора GIBsPLA2, и пептида, содержащего от 3 до 20 аминокислотных остатков, где указанный пептид получают способом, включающим (i) приведение в контакт тестируемого пептида с GIBsPLA2, (ii) выбор тестируемого пептида, который связывает GIBsPLA2, и (iii) выбор того пептида из (ii), который ингибирует активность GIBsPLA2.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1а-е показывают, что перед стимуляцией CD4 Т-клетки от VP демонстрируют aberrantное состояние активации с множеством больших мембранных микродоменов, на которые не влияет IL-7.

(а) Мембранные микродомены (ММД) маркировали субъединицей В холерного токсина (CtxB-AF488) и анализировали посредством STED микроскопии (микроскопии снижения индуцированной эмиссии). Сверху вниз очищенные CD4 Т-клетки от FID, VP, и ФГА-активированные (40 мкг/мл, 30 мин) HD Т-клетки. Для каждой группы верхней половины примерные CD4 Т-клетки до и после стимуляции IL-7 (2 нМ, 15 мин) показаны с сериями изображений срезов по оси Z. CD4 Т-лимфоциты также обрабатывали холестериноксидазой (ХОаза, 31 мкМ, 25 мин), плюс сфингомиелиназой (СМаза; 2,7 мкМ, 5 мин) перед стимуляцией IL-7.

(b, c) ММД подсчитывали по всей поверхности очищенных CD4 Т-клеток. В среднем оценивали 50 клеток, (b) HD клетки до (HDc: NS) и после стимуляции IL-7 (HDc: IL-7). (c) VP клетки до (VPc: NS) и после стимуляции IL-7 VP (VPc: IL-7), ФГА-активированные HD клетки до (HDc: PNA) и после стимуляции IL-7 (HDc: PNA/IL-7).

(d, e) Размер ММД определяли на поверхности очищенных CD4 Т-клеток (d) стимулированные IL-7 HD клетки (HDc: IL-7), (e) стимулированные IL-7 VP клетки (VPc: IL-7) и IL-7-стимулированные ФГА-активированные HD клетки (HDc: IL-7).

Фиг. 2а-с показывают, что цепи IL-7R из VP CD4 Т-клеток встроены в детергент-резистентные микродомены (ДРМ), на которые не оказывает влияние IL-7. Очищенные CD4 Т-лимфоциты лизировали (0,5% Тритон X-100), и 200 мкл лизата загрузили на 5-40% градиент сахарозы. После 16 ч центрифугирования (50000 об/мин) при 4°C собирали 18 фракций (#1 слева = верх пробирки = 5% сахарозы; #18 справа = дно пробирки = 40% сахарозы). Каждую фракцию анализировали на ДСН-ПАГЭ (7% акриламид-бисакриламид). Флотилин, IL-7R альфа и гамма-с обнаружили путем иммуноблоттинга (10).

(a) Флотилин использовали в качестве маркера для индикации фракций с низкой плотностью, соответствующих ДРМ, и фракций с высокой плотностью вне рафтов.

(b) Полосы IL-7R-альфа и (c) гамма-с показаны для очищенных не стимулированных HD CD4 Т-клеток (HDc: NS), IL-7-стимулированные HD клетки (HDc:IL-7), не стимулированные VP клетки (VPc:NS) и ФГА-активированные HD клетки (HDc:PHA).

Фиг. 3а-с показывают, что функция IL-7R повреждена в мембранных микродоменах VP CD4 Т-клеток.

(a) Скорости двумерной эффективной диффузии  $D_{\text{eff}}$  для IL-7R-альфа были измерены, как изображено на фиг. 7. Скорости диффузии были также измерены после добавления различных лекарств: ХОазы (31 мкМ, 30 мин), плюс СМазы (2,7 мкМ, 5 мин) (CO/SM), Col (10 мкМ, 30 мин), плюс CytD (20 мкМ, 30 мин) (CytD/Col), или в присутствии всех этих ингибиторов (all). Изучали CD4 Т-клетки из HD (HDc) и VP (VPc), а также ФГА-активированные HD CD4 Т-клетки (HDc: PHA). Столбцы указывают СКО от 5 независимых экспериментов. Дополнительные экспериментальные данные приведены на фиг. 8.

(b) IL-7-индуцированное фосфорилирование и ядерную транслокацию STAT5 проводили с применением кроличьих фосфо-STAT5, маркированных козьими антителами против кроличьих Atto642, и анализировали посредством импульсной STED микроскопии (срезы 0,5 мкм). В экспериментах использовали очищенные не стимулированные HD CD4 Т-клетки (HDc: NS), IL-7-стимулированные HD CD4 Т-клетки (HDc: IL-7), не стимулированные VP CD4 Т-клетки (VPc: NS), IL-7 стимулированные VP CD4 Т-клетки (VPc:IL-7), ФГА-активированные HD CD4 Т-клетки (HDc:PHA) и ФГА-активированные HD CD4 Т-клетки, стимулированные IL-7 (HDc:PHA/IL-7). Эффекты колхицина плюс цитохалазина D показаны на левой панели.

(c, d, e) После стимуляции IL-7 измеряли кинетику появления фосфо-STAT5 в цитоплазме и накопления в ядре, с применением программного обеспечения ImageJ. (c) HD CD4 Т-клетки (черная линия) и HD CD4 Т-клетки, обработанные Col плюс CytD (синяя линия), (d) VP CD4 Т-клетки (красная линия) и (e) ФГА-активированные HD CD4 Т-клетки (зеленая линия).

Фиг. 4а-d показывают, что плазма от VP индуцирует aberrantный характер активации в HD CD4 Т-клетках, по результатам определения числа ММД.

(a) Показаны примерные изображения HD CD4 Т-клеток, обработанных плазмой (10%) от VP (HDc: VPp), НИС (HDc: НИСр) или ART пациентов (HDc: ARTp). ММД окрашивали холерным токсином (CtxB-AF488). Для каждой группы показана верхняя половина изображений по оси Z примерных CD4 Т-клеток до (слева) и после стимуляции IL-7 (2 нМ, 15 мин) (справа).

(b) ММД, индуцированные на поверхности CD4 Т-клеток (HDc) плазмой (10%) от 5 разных VP (VPp1-VPp5). Результаты были получены от анализа 50 клеток до (белые) и после (синие) стимуляции IL-7. Показаны средние значения и квартили.

(c) Сравнение эффектов плазмы от HD (HDp), VP (VPp), НИС (НИСр) и ART пациентов (ARTp) после (синий) и до (белый) стимуляции IL-7.

(d) Ответ в зависимости от дозы (0,01-10%), полученный для плазмы, описанной на (c). Показано число ММД, индуцированных на поверхности HDc CD4 Т-клеток. Эффект VP плазмы показан непрерывной красной линией.

На фиг. 5а-d показано, что плазма от VP ингибирует IL-7-индуцированное фосфорилирование STAT5 и ядерную транслокацию фосфо-STAT5 в HD CD4 Т-лимфоцитах.

(a) Перед стимуляцией IL-7 очищенные HD CD4 Т-клетки предварительно инкубировали с плазмой (10%). IL-7-индуцированное фосфорилирование и ядерную транслокацию фосфо-STAT5 исследовали импульсной STED микроскопией (срезы 0,5 мкм). Исследовали следующую плазму: контроль (HDc: NS), VP (HDc: VPp), НИС (HDc: НИСр) и ART пациентов (HDc: ARTp).

(b) Анализ фосфо-STAT5 в цитоплазме (синий) и ядре (красный) IL-7-стимулированных HD CD4 Т-клеток, предварительно обработанных плазмой от 5 различных VP (10%).

(c) Сравнение эффектов предварительной инкубации с плазмой (10%) для IL-7-стимулированных HD CD4 Т-клеток. Плазму брали от HD (HDp), VP (VPp), НИС (НИСр) и ART пациентов (ARTp).

(d) Зависимый от дозы ответ (0,01-10%), полученный с плазмой, по результатам измерения ингибирования фосфо-STAT5 ядерной транслокации в IL-7-стимулированных HD CD4 Т-клетках. Эффект VP плазмы показан непрерывной красной линией.

На фиг. 6а-d показана молекулярная характеристика фактора, индуцирующего резистентность (RIF), извлеченного из плазмы VP.

(a) Обработка VP плазмы трипсином, ДНКазой, РНКазой и ПНГазой. RIF активность исследовали путем измерения числа ММД и влияния на IL-7-индуцированный ядерный фосфо-STAT5 в HD CD4 Т-клетках.

(b) Молекулярную массу RIF определяли путем гель-фильтрации на колонке с Сефадексом-G100. RIF активность на HD CD4 Т-клетках определяли путем измерения числа ММД, индуцированных различными фракциями с колонки (толстая красная кривая). Каждую фракцию также тестировали на присутствие вирусных белков путем дот-блоттинга с применением поликлональных антител из VP. Вычитали фон, полученный с HD плазмой. Эксперименты повторяли три раза.

(с) Молекулярную массу RIF также определяли после гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G100, и его активность после ингибирования IL-7-индуцированного фосфо-STAT5 определяли посредством FACS. Регистрировали процентное содержание максимально IL-7-индуцированных фосфо-STAT5. Также регистрировали количество белка в каждой фракции. Эксперименты повторяли дважды.

(d) Изоэлектрическую точку определяли следующим образом. RIF, элюированный с колонки с Сефадексом G100, загружали на анионо- (MonoQ) или катионо- (MonoS) обменную колонку. RIF активность элюировали буферами в ступенчатом градиенте pH. Строили кривую зависимости числа ММД на HD CD4 Т-клетках против pH.

На фиг. 7а-с показан двухмерный анализ в геле IL-7 сигналы на очищенных CD4 Т-клетках от HD, VP и IL-7 стимулированных HD клеток.

(a) Не стимулированные (NS) HD CD4 Т-клетки.

(b) VP CD4 Т-клетки.

(c) IL-7-стимулированные HD CD4 Т-клетки.

На фиг. 8а-г показан анализ скорости диффузии IL-7R-альфа на поверхности очищенных CD4 Т-клеток от HD, VP и ФГА-стимулированных HD клеток, (а, d) на поверхности HD CD4 Т-клеток, (b, e) на поверхности VP CD4 Т-клеток, (c, f) на поверхности HD CD4 Т-клеток, предварительно активированных ФГА (1 мкг/мл).

(g) Схема механизма диффузии IL-7R-альфа, встроенного в ММД, до и после обработки ингибиторами ММД или ингибиторами цитоскелета.

На фиг. 9а-d показано схематическое представление гипотетического способа действия RIF на HD CD4 Т-клетках, и механизм отсутствия ответа на IL-7. RIF индуцирует аномальные ММД, которые являются не функциональными. Таким образом, IL-7 сигналы повреждаются, и клетки остаются неспособными к ответу на цитокин, как в VP CD4 Т-клетках. Аберрантный способ активации и дефекты передачи сигнала в RIF-индуцированных HD CD4 Т-клетках и в VP CD4 Т-клетках являются неразличимыми. Левая часть схемы иллюстрирует различные этапы в механизмах передачи IL-7 сигнала в HD (10, 12).

(a) В покоящихся CD4 Т-клетках, перед распознаванием IL-7, цепи IL-7R являются ассоциированными, но их интрацитоплазматические домены отдалены, и сигнальные молекулы Jak1 и Jak3 не взаимодействуют.

(b) В IL-7 активированных CD4 Т-клетках IL-7R компартиментализован в нормальных ММД (90 нм в диаметре), и сигналы становятся функциональными. После организации цитоскелета STAT5A и STAT5B фосфорилируются в контакте с IL-7R/Jak1/Jak3 комплексами, затем мигрируют в ядро путем передвижения по микротрубочкам, как обсуждалось ранее (12).

Правая часть схемы иллюстрирует гипотетический механизм действия RIF. Предложенный механизм действия получен из предварительных данных и сравнения RIF-индуцированных дефектов с нарушениями, характеризующими очищенные CD4 Т-клетки от VP (неопубликованные данные).

(c) RIF индуцирует много больших аномальных ММД. IL-7R встроен в аномальные ММД, и его способность к индукции функциональной сигналы нарушена.

(d) Обработанные RIF HD CD4 Т-клетки не отвечали на IL-7. Jak1 и Jak3 фосфорилируют STAT5, хотя со сниженной кинетикой, но фосфо-STAT5 не мигрирует в ядро из-за отсутствия организации цитоскелета и микротрубочек.

На панелях a, b, c и d показаны изображения, полученные при STED микроскопии ММД, маркированных StxB: AF488 (половина столбца по Z-оси от CW-STED). На панелях b и d показан тубулин, окрашенный кроличьими антителами к тубулину/козьими антителами против кроличьего Atto642; актин, окрашенный мышинными антителами к актину/козьими антителами против мышинного Chr494, и фосфо-STAT5, окрашенный кроличьими антителами к фосфо-STAT5/козьими антителами к кроличьему Atto642. Импульсная STED микроскопия демонстрирует 0,5 мкм срез CD4 Т-клеток, обработанных метанолом. После стимуляции IL-7, актин в ММД цитоплазматической области RIF-обработанных HD CD4 Т-лимфоцитов был неспособен концентрироваться в виде структурированных подушек и не формировал кортекс, окружающий ядро, в отличие от HD. Далее тубулин в этих RIF-обработанных HD CD4 Т-клетках, как в VP CD4 Т-клетках, не может формировать микротрубочки, которые, как предполагается, играют ключевую роль в формировании моста между цитоплазмой и ядерной мембраной и, таким образом, необходимы для ядерной транслокации STAT5.

Обобщение дефектов: кружки с номерами 1, 2, 3 и 4 указывают различные дефектные этапы, связанные с аберрантным режимом активации и неспособностью к ответу на IL-7 в RIF-обработанных HD Т-клетках: (1) аномальный характер белков сигнального комплекса, как описано двумерными гелями, (2) аномальные мембранные структуры, такие как большие ММД, как видно при STED микроскопии, (3) аномальная организация цитоскелета, как определено по кинетике диффузии и с помощью STED микроскопии, и (4) аномальные промежуточные переносчики сигналов и ингибирование ядерной транслокации фосфо-STAT5, как показано STED микроскопией.

Фиг. 10. PLA2sG1B ингибирует индуцированную IL-2 ядерную транслокацию PStat5 в CD4 Т-клетках здоровых доноров (HD). Покоящиеся CD4 Т-клетки, очищенные от 4 здоровых доноров, обрабатывали в течение 30 мин при 37°C с 3% или 1% плазмой от 5 VP (VP63, VP68, VP69, VP74 и VP75) и от 3

HD, использованных в качестве контроля. Когда указано, их стимулировали с 2нМ IL-2 в течение 15 мин при 37°C. Процентное содержание клеток, позитивных на ядерный PStat5, со средним значением и СКО, показано во всех CD4 Т-клетках (а) и в CD4+CD25+ Т-клетках (б), до (синие точки) и после стимуляции IL-2 (красные точки). Внутриклеточную локализацию PStat5 наблюдали с применением лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (LSM 700, Zeiss) после непрямого окрашивания кроличьими антителами к человеческому PStat5 (pY694), с последующей обработкой ослиными антителами к кроличьему IgG с красителем Die light 405. Общие CD4 Т-клетки окрашивали козьими антителами к человеческому b-тубулину, а затем ослиными антителами к козьему IgG-AF555. CD25+ CD4 Т-клетки обрабатывали мышинными антителами к человеческому CD25, а затем ослиными антителами к мышинному IgG-AF488.

Фиг. 11. PLA2sG1B ингибирует IL-4 индуцированную ядерную транслокацию PStat6 в CD4 Т-клетках здоровых доноров (HD). Покоящиеся CD4 Т-клетки, очищенные от 4 здоровых доноров, обрабатывали в течение 30 мин при 37°C с 3% или 1% плазмы от 5 VP (VP63, VP68, VP69, VP74 и VP75) и от 3 HD, использованных в качестве контроля. Когда указано, их стимулировали 2 нМ IL-4 в течение 15 мин при 37°C. Показано процентное содержание клеток, позитивных на наличие ядерного PStat6, со средним значением и СКО, во всех CD4 Т-клетках, до (синие точки) и после стимуляции IL-2 (красные точки). Внутриклеточную локализацию PStat6 наблюдали с применением лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (LSM 700, Zeiss) после непрямого окрашивания кроличьими антителами к человеческому PStat6 (pY694), с последующей обработкой козьими антителами к кроличьему IgG-AF488. Общие CD4 Т-клетки окрашивали мышинными антителами к человеческому альфа-тубулину, а затем козьими антителами к мышинному IgG-AF647.

Фиг. 12. Отсутствие активности мутантной pPLA2G1B H48Q.

Фиг. 13. Сравнение активности клонированной свинной PLA2 G1B дикого типа и ее мутанта H48Q. А: индукция аномальных мембранных микродоменов (аММД); В: влияние на IL-7 индуцированную ядерную транслокацию фосфо-STAT5 (NT pSTAT5).

На фиг. 14 показана обработка плазмы от пациентов с вирусемией козьими антителами к PLA2 G1B, связанными с сепарозными гранулами. Зеленый: VP68; розовый: VP69; синий: VP LJT. После обработки (30 мин при комнатной температуре) тестировали плазму.

а) Определяли процентное содержание CD4 Т-клеток, демонстрирующих аномальные ММД, после окрашивания холерным токсином В (CtxB-AF488).

б) Определяли ядерную транслокацию pSTAT5 после стимуляции IL-7, и подсчитывали процентное содержание позитивных ядер.

Фиг. 15. Влияние анти-PLA2 G1B антител на индукцию аММД и ингибирование NT pSTAT5.

Фиг. 16. Растворимый PLA2G1B мышинный рецептор (sMR) ингибирует активность человеческой PLA2G1B (huPLA2G1B) в отношении ответа на IL-7 CD4 Т-клеток от здоровых доноров, при выражении в виде процентного содержания клеток, позитивных на ядерную транслокацию PStat5. Восстановление ответа рассчитывали как

$100 \times (\% \text{ позитивных клеток}_{\text{huG1B+sMR}} - \% \text{ позитивных клеток}_{\text{huG1B}}) / (\% \text{ позитивных клеток}_{\text{в культуральной среде}} - \% \text{ позитивных клеток}_{\text{huG1B}})$ .

Фиг. 17 показывает, что плазма от пациентов с не отвечающими CD4 (CD4-NR) индуцирует aberrantные ММД в HD CD4 Т-клетках.

(а) Изображения HD CD4 Т-клеток, обработанных плазмой (1%) от CD4-NR пациента, полученные с применением микроскопии структурированного освещения (SIM). ММД окрашивали холерным токсином В (CtxB-AF488). Показана выдающаяся часть изображений по Z-оси примерных CD4 Т-клеток. После стимуляции IL-7 (2 нМ, 15 мин) не отмечалось изменения изображения (справа).

(б) Кривая ответа в зависимости от дозы (0,0001%-1%), полученная для плазмы от 5 CD4-NR пациентов (синяя кривая, среднее значение и СКО) и от примерного больного с вирусемией (красная кривая). Число аномальных ММД, индуцированных на поверхности HD CD4 Т-клеток.

#### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам модуляции иммунной системы у субъекта, нуждающегося в этом. В частности, изобретение раскрывает идентификацию G1BsPLA2 в качестве ключевого эндогенного фактора иммунного ответа и обеспечивает новые терапевтические и диагностические способы и композиции на основе модуляции этого фактора.

Гипотезой настоящего изобретения было то, что хроническая активация иммунной системы у ВИЧ-инфицированных больных является аномальной и направляет CD4 Т-клетки в aberrantное состояние активации/дифференцировки, при котором отсутствует ответ на гамма-с цитокины, вовлеченные в контроль многих аспектов иммунной защиты и гомеостаза CD4 компартмента, несмотря на тот факт, что более 99,5% CD4 Т-клеток из периферического компартмента являются неинфицированными. Эту гипотезу оценивали авторы настоящего изобретения, и настоящее изобретение проливает свет на природу и значимость этого aberrantного состояния активации.

В частности, в первом аспекте настоящее изобретение демонстрирует, что характеристики этого состояния могут быть обобщены следующим образом: 1) перед какой-либо стимуляцией все CD4 Т-клетки

у ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусемией (VP) обладают многочисленными большими ММД на своей поверхности, 2) эти аномальные ММД секвестрируют все клеточные IL-7R-альфа и гамма-с цепи, и 3) эта секвестрация цепей в аномальных ММД нарушает их способность к индукции образования функциональной сигналы, 4) приводя к замедлению и уменьшению STAT5 фосфорилирования и 5) снижению ядерного импорта фосфо-STAT5. Этот аномальный характер предварительно существующих ММД на поверхности VP CD4 Т-лимфоцитов имеет множество последствий и является основным механизмом, объясняющим различные проявления иммунодефицита у ВИЧ-инфицированных пациентов. Потеря ответа на IL-7 является важным фактором, который отчасти объясняет наблюдаемую CD4 лимфопению. Стойкая потеря этих клеток у VP, обусловленная их чувствительностью к апоптозу и их разрушением при низкоуровневой, но постоянной вирусной пролиферации, не может быть компенсирована, несмотря на повышенные уровни IL-7. Кроме того, поскольку аномальные ММД секвестрируют все гамма цепи в не функциональном состоянии, это блокирует функцию других цитокинов этого семейства.

Настоящее изобретение далее раскрывает идентификацию ключевых эндогенных факторов, ответственных за это аномальное состояние иммунной системы у инфицированных субъектов и в целом ответственных за интенсивную модуляцию иммунного ответа при различных патофизиологических состояниях. Было показано, что образцы плазмы от VP действительно содержат активность, обозначенную как RIF, которая способна к индукции aberrантной CD4 Т-лимфоцитов от здоровых доноров (HD). RIF был найден во всех исследованных образцах плазмы VP. Патофизиологическое значение этой активности было продемонстрировано по ее отсутствию у пациентов с контролируемым ВИЧ (HIC), у которых система IL-7/IL-7R является нормальной, а иммунная активация является благоприятной. RIF также отсутствует в плазме ART пациентов, у которых снижена иммунная активация, восстановлена функция IL-7R и восстановлено количество CD4 > 500/мм<sup>3</sup> (5).

Таким образом, RIF представляет основной фактор, который контролирует иммунный ответ, в частности, через модуляцию CD4 Т-лимфоцитов. Примечательно, что RIF индуцирует aberrантный характер активации HD CD4 Т-клеток, который неотличим того, что наблюдается непосредственно ex vivo в очищенных VP CD4 Т-клетках. Изобретение далее показывает, что RIF является секреторируемой фосфолипазой A2 из группы IB ("PLA2 GIB"). Результаты, раскрытые в настоящем изобретении, показывают, что (i) избыточная экспрессия PLA2 GIB приводит к мощной иммуносупрессии, и что (ii) ингибирование PLA2 GIB приводит к значительному повышению стимуляции иммунной функции. Ингибиторы GIBsPLA2 были способны к коррекции ненадлежащего состояния иммунных клеток в плазме субъектов, и, таким образом, могут быть использованы для лечения (например, профилактики, коррекции) иммунодефицита или иммунных нарушений у млекопитающих. Ингибирование GIBsPLA2 может также индуцировать, стимулировать или способствовать сохранению количества и функций CD4 Т-клеток и, таким образом, способствует стимуляции эффективного иммунного ответа у пациентов. В частности, у ВИЧ-инфицированных пациентов можно уменьшить или остановить ART, где может быть достигнуто равновесие между иммунной защитой пациента и вирусом. Если ART, назначенную рано после инфекции, как предполагается недавними исследованиями, объединить с ингибиторами RIF, это позволит предотвратить любое RIF-индуцированное нарушение иммунной системы. Кроме того, в контексте некоторых современных неудач ART пациенты с низким количеством CD4 после длительной ART могут получать пользу от этих ингибиторов. Соответственно изобретение обеспечивает способы лечения субъекта посредством модуляции экспрессии или активности GIBsPLA2 у субъекта. В частности, изобретение обеспечивает способ модуляции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в ней, включающий модуляцию модуляции экспрессии или активности GIBsPLA2 у указанного субъекта.

Данные, обеспеченные в примерах, также демонстрируют, что присутствие RIF в плазме субъекта указывает на ВИЧ-индуцированный патогенез состояния CD4 Т-клеток. Соответственно настоящее изобретение обеспечивает способы мониторинга и/или диагностики ВИЧ-инфекции у субъекта путем определения уровня RIF в плазме субъекта, среди прочего.

Данные, обеспеченные в примерах, дополнительно демонстрируют, что число и/или размер мембранных микродоменов (ММД) на Т-клетках субъекта указывают на ВИЧ-индуцированный патогенез состояния CD4 Т-клеток. Соответственно это изобретение также обеспечивает способы мониторинга и/или диагностики ВИЧ-инфекции у субъекта путем определения числа и/или размера мембранных микродоменов (ММД) на Т-клетках субъекта, среди прочего.

Данные, обеспеченные в примерах, также указывают на роль RIF в создании и/или сохранении патологического состояния CD4 Т-клеток у ВИЧ-инфицированных субъектов. Соответственно это изобретение также обеспечивает способы для идентификации потенциального терапевтического агента для ВИЧ, которые включают сравнение RIF-индуцированной CD4 Т-клеточной активации в присутствии агента с уровнем RIF-индуцированной CD4 Т-клеточной активации при отсутствии агента.

#### Определения

Термин "идентичность последовательности", как применяется к нуклеиновокислотной или белковой последовательности, относится к количественному выражению (обычно в процентах) нуклеотидов или аминокислотных остатков, совпадающих по меньшей мере в двух последовательностях, выровненных с применением стандартизированного алгоритма, такого как выравнивание Smith-Waterman (Smith

and Waterman (1981) J Mol Biol 147:195-197), CLUSTALW (Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res 22:4673-4680), или BLAST2 (Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res 25:3389-3402). BLAST2 можно использовать стандартизированным и воспроизводимым образом для вставки пробелов в одну из последовательностей для оптимизации выравнивания и для достижения более осмысленного сравнения между ними.

Как применяется в настоящем изобретении, "лечение" или "обработка" означают клиническое вмешательство с целью изменения естественного курса у индивидуума, подлежащего лечению, и могут проводиться с профилактической или лечебной целью.

Необходимые эффекты лечения включают профилактику развития или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение каких-либо прямых или непрямых патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, облегчение или ослабление патологического состояния и ремиссию или улучшение прогноза, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы из изобретения применяют для замедления развития заболевания или нарушения, или для замедления прогрессирования заболевания или нарушения.

Термин "изолированный", как применяется в настоящем изобретении, относится к молекулам (например, нуклеиновой кислоты или аминокислоты), которые удаляют из компонента из их природной среды, выделяют или сепарируют и которые по меньшей мере на 60% свободны, предпочтительно на 75% свободны и наиболее предпочтительно на 90% свободны от других компонентов, с которыми они природно ассоциированы. "Изолированный" полипептид (или белок) является, например, полипептидом, выделенным из компонента из его природной среды и предпочтительно очищенным до более чем 90% или 95% чистоты, как определено, например, посредством электрофореза (например, ДСН-ПАГЭ, изоэлектрофокусирования (ИЭФ), капиллярного электрофореза) или хроматографии (например, ионообменной или обращенно-фазовой ВЭЖХ). "Изолированная" нуклеиновая кислота означает молекулу нуклеиновой кислоты, отделенную от компонента из его природной среды и/или собранную в отличающуюся конструкцию (например, вектор, кассету экспрессии, рекомбинантный хозяин и т.д.).

"Нуклеиновая кислота, кодирующая анти-GIBsPLA2 антитело" означает одну или несколько молекул нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и легкие цепи антитела (или его фрагменты), включая такую молекулу (молекулы) нуклеиновых кислот в единичном векторе или отдельных векторах, и такую молекулу(ы) нуклеиновых кислот, присутствующую на одном или нескольких участках клетки-хозяина.

"Субъект" означает млекопитающее. Примеры млекопитающих включают людей и животных, не являющихся людьми, таких как, без ограничения, домашние животные (например, коровы, овцы, и собаки, и лошади); приматы, не являющиеся человеком (такие как обезьяны); кролики, и грызуны (например, мыши и крысы).

"Модуляция иммунного ответа" означает, в контексте настоящего изобретения, любую модификацию количества или активности или соотношения иммунных клеток, предпочтительно белых кровяных клеток (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК, НКТ-клеток, макрофагов, дендритных клеток). В частном варианте осуществления модуляция иммунного ответа включает модуляцию количества или активности Т-лимфоцитов, предпочтительно CD4-Т-лимфоцитов.

Фактор, индуцирующий резистентное состояние клетки (RIF) или фосфолипаза А2 группы IB.

Термин "RIF" применяется взаимозаменяемо с термином "фосфолипаза А2 группы IB", "GIBsPLA2" (или PLA2 GIB). Фосфолипаза А2 группы IB является секретуемым белком, имеющим молекулярную массу примерно от 15 кДа и изоэлектрическую точку примерно от 6,5 до 8,0.

В контексте настоящего изобретения термин "GIBsPLA2" или "фосфолипаза А2 группы IB" означает любой нативный GIBsPLA2 белок от любого позвоночного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши крысы), если не указано иное. Термин охватывает "полноразмерную", непроцессированную GIBsPLA2, а также любую форму GIBsPLA2, полученную при процессинге внутри или вне клетки. Термин также охватывает природные варианты GIBsPLA2, например, сплайс-варианты или аллельные варианты.

Аминокислотная последовательность примерно человеческой GIBsPLA2 показана ниже (SEQ ID NO: 2).

**MKLLVLAVLLTVAAADSGISPR****AVWQFRKMIKCVIPGSDPFLEYNNYGCYCGLG**  
**GS****GTPVDELDKCCQTHDNCYDQAKKLD****SCKFLLDN****PYTHTYSYSCSGSAITCSSKNKEC**  
**EAFICNCDRNAAICFSKAPYNKANKNLDTK****KYCQS**

Аминокислоты 1-15 из SEQ ID NO: 2 (подчеркнутые) являются сигнальной последовательностью, аминокислоты 16-22 из SEQ ID NO: 2 (жирным шрифтом) являются пропептидной последовательностью. Зрелый белок соответствует аминокислотным остаткам 23-148 из SEQ ID NO: 2, который является примером процессированного человеческого GIBsPLA2 белка.

Природные варианты включают любой белок, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2, или последовательность из аминокислотных остатков 23-148 из SEQ ID NO: 2, с одной или несколькими аминокислотными заменами, добавлениями и/или делециями одного или нескольких (как правило, 1, 2



или 3) аминокислотных остатков, предпочтительно не более чем с 10 отдельными аминокислотными заменами, добавлениями и/или делециями одного или нескольких (как правило, 1, 2 или 3) аминокислотных остатков. Типичные природные варианты сохраняют биологическую активность SEQ ID NO: 2.

В связи с этим в некоторых вариантах осуществления GIBsPLA2 имеет по меньшей мере одну активность, выбранную из индукции образования мембранных микродоменов (ММД) в CD4 Т-клетках от здоровых субъектов, или обеспечение у CD4 Т-клеток здоровых субъектов резистентности к сигналам интерлейкинов, такой как резистентность к сигналам IL-2 или резистентность к сигналам IL-7.

В некоторых вариантах осуществления индукция образования ММД включает повышение числа ММД на CD4 Т-клетках здоровых субъектов по меньшей мере примерно до 80 на клетку, по меньшей мере примерно до 90 на клетку, по меньшей мере примерно до 100 на клетку, по меньшей мере примерно до 110 на клетку или по меньшей мере примерно до 120 на клетку. В не ограничивающем предпочтительном варианте осуществления индукция образования ММД включает повышение числа ММД на CD4 Т-клетках здоровых субъектов более чем до 100 ММД на клетку.

В некоторых вариантах осуществления индукция образования ММД включает стимуляцию образования более крупных ММД, чем те, которые в иных случаях присутствуют на CD4 Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления индукция образования более крупных ММД включает стимуляцию образования ММД, имеющих диаметр по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 110 нм, по меньшей мере 120 нм, по меньшей мере 130 нм или по меньшей мере 140 нм. В не ограничивающем предпочтительном варианте осуществления индукция образования более крупных ММД включает стимуляцию образования ММД, имеющих диаметр больше 120 нм.

В некоторых вариантах осуществления обеспечение резистентности CD4 Т-клеток здоровых субъектов к сигналам интерлейкина-7 включает снижение STAT5A и/или В фосфорилирования в указанных клетках по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30% или по меньшей мере примерно на 40%. В некоторых вариантах осуществления обеспечение резистентности CD4 Т-клеток здоровых субъектов к сигналам интерлейкина-7 включает снижение уровня ядерной транслокации фосфо-STAT5A и/или фосфо-STAT5B по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40% или по меньшей мере примерно на 50%.

Активность GIBsPLA2 можно измерить любым подходящим способом, известным в данной области техники, как иллюстрировано в примерах, или разработанным позднее. Активность GIBsPLA2 можно измерить в образце плазмы, например, таком как образец фракционированной плазмы, с применением, например, анализов с привлечением лиганда, иммуноанализов и/или ферментативных анализов.

В частном варианте осуществления термин GIBsPLA2 означает человеческий белок, в частности белок, включающий или имеющий SEQ ID NO: 2, или его природный вариант.

GIBsPLA2 в соответствии с настоящим изобретением может быть изолированной, очищенной и/или рекомбинантной. В некоторых вариантах осуществления изобретение может применять вместо или в дополнение к GIBsPLA2 белку, нуклеиновую кислоту, кодирующую GIBsPLA2. Нуклеиновой кислотой может быть ДНК или РНК, одно- или двухцепочечная.

Примерная нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая GIBsPLA2, показана в SEQ ID NO: 1 ниже.

```

ATGAAACTCCTTGTGCTAGCTGTGCTGCTCACAGTGGCCGCCGCGACAGCG
GCATCAGCCCTCGGGCCGTGTGGCAGTTCGCGAAAATGATCAAGTGC GTGATCCCG
GGGAGTGACCCCTTCTTGAATACAACAACACTACGGCTGCTACTGTGGCTTGGGGGGC
TCAGGCACCCCGTGGATGAACTGGACAAGTGCTGCCAGACACATGACAACCTGCTA
CGACCAGGCCAAGAAGCTGGACAGCTGTAAATTTCTGCTGGACAACCCGTACACCC
ACACCTATTCATACTCGTGCTCTGGCTCGGCAATCACCTGTAGCAGCAAAAACAAAG
AGTGTGAGGCCTTCATTTGCAACTGCGACCGCAACGCTGCCATCTGCTTTTCAAAG
CTCCATATAACAAGGCACACAAGAACCTGGACACCAAGAAGTATTGTGTCAGAGTTGA

```

Альтернативные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей GIBsPLA2, включают любой вариант SEQ ID NO: 1, который получен вследствие вырожденности генетического кода, а также любую последовательность, гибридирующуюся с SEQ ID NO: 1 в жестких условиях, более предпочтительно имеющую по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и кодирующую GIBsPLA2 белок.

#### Способ получения GIBsPLA2

GIBsPLA2 можно получить любым обычным известным способом экспрессии и способом очистки белка. Например, можно применять (i) способ синтеза пептидов; (ii) способ их очистки и изоляции из живого организма или культивируемых клеток; (iii) способ их получения с применением методик генетической рекомбинации; и их комбинации или тому подобное (например, стандартные методики, опи-

санные в "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press) (1989) ("Молекулярное клонирование") и "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, F. M., John Wiley and Sons, Inc. (1989) ("Современные протоколы молекулярной биологии"))).

В частном варианте осуществления изобретение относится к способу получения GIBsPLA2 путем экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине и сбора или очистки GIBsPLA2. В связи с этим изобретение также описывает рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую GIBsPLA2. Такие клетки могут быть прокариотическими (такими, как бактерии) или эукариотическими (такими, как дрожжевые клетки, клетки насекомых, растительные клетки или клетки млекопитающих). Нуклеиновую кислоту можно поместить под контроль любой подходящей регуляторной последовательности, такой как промотор, терминатор, или тому подобное. Альтернативно нуклеиновая кислота может быть вставлена в клетку-хозяина в участок, где экспрессия управляется эндогенным промотором. Методики вставки нуклеиновых кислот в клетки хорошо известны в данной области техники.

#### Модуляция GIBsPLA2

Изобретение обеспечивает новый способ, включающие модуляцию GIBsPLA2 у субъекта, нуждающегося в этом. Термин "модуляция" означает любую модификацию уровня (например, экспрессии) или активности GIBsPLA2 у субъекта. Кроме того, модуляция означает либо повышение, либо снижение уровня или активности GIBsPLA2. Более предпочтительно модуляция означает изменение по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80% или больше, по сравнению с не модулированным состоянием. В результате ингибирования GIBsPLA2 означает снижение по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80% или больше уровня или активности GIBsPLA2, а также полную блокаду или супрессию уровня или активности GIBsPLA2. Напротив, стимуляция GIBsPLA2 означает повышение по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80% или больше уровня или активности GIBsPLA2. В зависимости от ситуации модуляция может быть временной, длительной или непрерывной. Кроме того, модуляция активности включает модуляцию количества GIBsPLA2 у субъекта, в частности в жидкостях организма, модуляцию мощности белка (например, путем модуляции уровня кофакторов или субстрата у субъекта) и модуляцию уровня или активности продуктов деградации, образуемых GIBsPLA2.

#### Ингибирование GIBsPLA2

В частном варианте осуществления изобретение обеспечивает композиции и способы для ингибирования GIBsPLA2 у субъекта. Ингибирование GIBsPLA2 может быть достигнуто путем применения ингибиторов GIBsPLA2, т.е. любого соединения, которое ингибирует экспрессию или активность GIBsPLA2. Ингибиторы GIBsPLA2 включают ингибиторы экспрессии, антагонисты, секвестраторы или соединения, маскирующие мишень. Предпочтительные типы ингибиторов GIBsPLA2 включают GIBsPLA2 лиганды (ковалентные или не ковалентные), анти-GIBsPLA2 антитела (и их фрагменты и производные), нуклеиновые кислоты, кодирующие анти-GIBsPLA2 антитела (или их фрагменты и производные), ингибирующие нуклеиновые кислоты, пептиды, или низкомолекулярные лекарства, или их комбинацию(и). Альтернативно или в дополнение, ингибирование GIBsPLA2 может быть достигнуто путем вакцинации субъекта против GIBsPLA2 антигена, так чтобы у субъекта, нуждающегося в ингибировании GIBsPLA2, вырабатывались антитела.

#### Антитела против GIBsPLA2

Специфическими примерами ингибиторов GIBsPLA2 являются антитела, специфически связывающиеся с GIBsPLA2.

Антитела могут быть синтетическими, моноклональными, или поликлональными, и могут быть получены посредством методик, хорошо известных в данной области техники. Такие антитела специфически связывают через антиген-связывающие участки антитела (в отличие от неспецифического связывания). GIBsPLA2 полипептиды, фрагменты, варианты, гибридные белки и т.д. можно применять в качестве иммуногенов при получении антител, дающих иммунную реакцию с ними. В частности, полипептиды, фрагменты, варианты, гибридные белки и т.д. содержат антигенные детерминанты или эпитопы, которые вызывают образование антител.

Эти антигенные детерминанты или эпитопы могут быть линейными или конформационными (прерывистыми). Линейные эпитопы состоят из единственной секции аминокислот из полипептида, в то время как конформационные или прерывистые эпитопы состоят из аминокислотных секций с различными участками полипептидной цепи, которые тесно сближаются друг с другом при фолдинге белка (С.А. Janeway, Jr. and P. Travers, *Immuno Biology* 3:9 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). Поскольку свернутые белки имеют сложные поверхности, доступное число эпитопов является довольно большим; однако из-за конформации белка и стерических ограничений, число антител, которые действительно связываются с эпитопами, меньше числа доступных эпитопов (С.А. Janeway, Jr. and P. Travers, *Immuno Biology* 2:14 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). Эпитопы можно идентифицировать любыми способами, известными в данной области техники. Как поликлональные, так и моноклональные антитела можно приготовить посредством стандартных методик.

Предпочтительные антитела из настоящего изобретения направлены на GIBsPLA2 эпитоп и/или созданы путем иммунизации полипептидом, включающим GIBsPLA2 эпитоп, выбранный из зрелого GIBsPLA2 белка, фрагмента GIBsPLA2, включающего по меньшей мере 8 последовательных аминокислот-

ных последовательностей из SEQ ID NO: 2 (или соответствующих остатков природного варианта SEQ ID NO: 2), где указанный фрагмент включает по меньшей мере аминокислоту 70, аминокислоту 121, аминокислоту 50, аминокислоту 52, аминокислоту 54, аминокислоту 71 или их комбинацию. Предпочтительные антитела из настоящего изобретения связывают эпитоп, включая эпитоп между аминокислотными остатками 50-71 из SEQ ID NO: 2 или соответствующие остатки из природного варианта SEQ ID NO: 2.

Термин "антитела" подразумевает включение поликлональных антител, моноклональных антител, их фрагментов, таких как F(ab')<sub>2</sub> и Fab фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFvs), однодоменные антитела (VHH или нанотела), бивалентные фрагменты антител (диатела); а также любых рекомбинантных и синтетически полученных партнеров связывания, человеческих антител или гуманизированных антител.

Антитела определяются как специфически связывающие, если они предпочтительно связываются с GIBsPLA2 со значением K<sub>a</sub>, равным или превышающим примерно 10<sup>7</sup> М<sup>-1</sup>. Аффинности антител можно легко определить с применением обычных методик, например, таких, как описано Scatchard et al, Ann. N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949).

Поликлональные антитела можно легко получить из различных источников, например от лошадей, коров, ослов, коз, овец, собак, кур, кроликов, мышей или крыс, с применением процедур, хорошо известных в данной области техники. В целом очищенную GIBsPLA2 или пептид на основе аминокислотной последовательности GIBsPLA2, конъюгированный подходящим образом, вводят животному-акцептору, как правило, посредством парентеральной инъекции. Иммуногенность GIBsPLA2 может быть усилена путем применения адъюванта, например полного или неполного адъюванта Фрейнда. После бустерной иммунизации собирают небольшие образцы сыворотки и тестируют реактивность в отношении GIBsPLA2 полипептида. Примеры различных анализов, пригодных для такого определения, включают те, которые описаны в "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 ("Антитела: лабораторное руководство"); а также такие процедуры, как встречный иммуноэлектрофорез (ВИЭФ), радиоиммунный анализ, радиоиммунопреципитация, иммуноферментный анализ (ИФА), дот-блоттинг, и сэндвич-анализы. См. патенты США №№ 4376110 и 4486530.

Моноклональные антитела можно легко получить с применением хорошо известных процедур. См., например, процедуры, описанные в патентах США №№ RE 32011, 4902614, 4543439 и 4411993; "Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses", Plenum Press, Kennett, McKean, and Bechtol (eds.), 1980 ("Моноклональные антитела, гибридомы: новый аспект биологических анализов").

Например, животным-акцепторам, таким как мыши, можно ввести интраперитонеально по меньшей мере один раз и предпочтительно два раза с интервалом около 3 недель изолированный и очищенный не мутантный или мутантный GIBsPLA2 белок или конъюгированный GIBsPLA2 пептид, факультативно в присутствии адъюванта.

Мышиные сыворотки затем анализируют обычной методикой дот-блоттинга или иммобилизации антител (ABC), чтобы определить, какое животное лучше использовать. Примерно две-три недели спустя мыши получают внутривенную бустерную инъекцию белка или пептида. Затем мышей умерщвляют и клетки селезенки сливают с коммерческими миеломными клетками, такими как Ag8.653 (ATCC), следуя установленным протоколам. Вкратце, клетки миеломы промывают несколько раз средой и гибридизуют с мышиными клетками селезенки в отношении примерно три клетки селезенки на одну клетку миеломы. Гибридизующий агент может быть любым подходящим агентом, используемым в данной области техники, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ). Гибридомы помещают на пластины, содержащие среду, обеспечивающую избирательный рост гибридных клеток. Гибридные клетки затем могут оставлять для выращивания примерно на восемь суток. Надосадочные жидкости от полученных гибридом собирают и добавляют на планшет, который вначале покрывают козьими антителами к иммуноглобулинам мыши. После промывания добавляют метку, такую как маркированный GIBsPLA2 полипептид, в каждую лунку, а затем инкубируют. Затем можно определить положительные лунки. Позитивные клоны затем выращивают в смешанной культуре, а затем очищают надосадочную жидкость на колонке с протеином А (Pharmacia).

Моноклональные антитела из изобретения можно получить с применением альтернативных методик, таких как те, которые описаны Altling-Mees et al., "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", Strategies in Molecular Biology 3:1-9 (1990) ("Библиотеки экспрессии моноклональных антител: быстрая альтернатива гибридомам"), включенной посредством ссылки. Подобным образом, партнеры связывания можно сконструировать с применением методик рекомбинантной ДНК для включения различных областей гена, кодирующего специфическое связывающее антитело. Такая методика описана, например, в Larrick et al., Biotechnology, 7:394 (1989).

Антиген-связывающие фрагменты таких антител, которые можно получить путем обычных методик, также охватываются настоящим изобретением. Примеры таких фрагментов включают Fab и F(ab')<sub>2</sub> фрагменты, но не ограничиваются ими. Также обеспечиваются фрагменты и производные антител, полученные методиками генетической инженерии.

Моноклональные антитела из настоящего изобретения включают химерные антитела, например гуманизированные версии мышиных моноклональных антител. Такие гуманизированные антитела могут быть приготовлены посредством известных методик и обеспечивают преимущество сниженной иммуно-

генности при введении антител человеку.

В одном варианте осуществления гуманизированные моноклональные антитела содержат переменную область мышинного антитела (или просто его антиген-связывающий участок) и константную область, полученную из человеческого антитела. Альтернативно фрагмент гуманизированного антитела может содержать антиген-связывающий участок мышинного моноклонального антитела и фрагмент переменной области (не содержащий антиген-связывающий участок), полученный из человеческого антитела. Процедуры получения химерных и других инженерных моноклональных антител включают те, которые описаны в Riechmann et al. (*Nature* 332:323, 1988), Liu et al. (*PNAS* 84:3439, 1987), Larrick et al. (*Bio/Technology* 7:934, 1989), и Winter and Harris (*TIPS* 14:139, May, 1993). Процедуры трансгенного получения антител можно найти в GB 2272440, патентах США №№ 5569825 и 5545806.

Можно применять антитела, полученные генно-инженерными способами, такие как химерные и гуманизированные моноклональные антитела, включающие человеческие и не человеческие части, которые можно изготовить с применением стандартных методик рекомбинантной ДНК. Такие химерные и гуманизированные моноклональные антитела можно получить путем генной инженерии с применением стандартных методик ДНК, известных в данной области техники, например, с применением способов, описанных в Robinson et al., Международной публикации № WO 87/02671; Akira, et al. Европейской патентной заявке 0184187; Taniguchi, M., Европейской патентной заявке 0171496; Morrison et al., Европейской патентной заявке 0173494; Neuberger et al., PCT Международной патентной публикации №WO 86/01533; Cabilly et al., патенте США № 4816567; Cabilly et al., Европейской патентной заявке 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., *Cane. Res.* 47:999 1005, 1987; Wood et al., *Nature* 314:446 449, 1985; и 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 U.S. Pat. No. 5,225,539; Jones et al., *Nature* 321:552 525, 1986; Verhoeyan et al., *Science* 239:1534, 1988; nBeidler et al., *J. Immunol.* 141:4053 4060, 1988.

В отношении синтетических и полусинтетических антител, такие термины предназначены для охвата фрагментов антител, антител с переключением изотипа, гуманизированных антител (например, мышинных-человеческих, человеческих-мышинных), гибридов, антител с множественной специфичностью и полностью синтетических антитело-подобных молекул, но не для их ограничения.

Для терапевтических приложений "человеческие" моноклональные антитела, имеющие человеческие константные и переменные области, часто являются предпочтительными, чтобы свести к минимуму иммунный ответ пациента на антитело. Такие антитела могут быть получены путем иммунизации трансгенных животных, которые содержат гены человеческих иммуноглобулинов. См. Jakobovits et al. *Ann NY Acad Sci* 764:525-535 (1995).

Человеческие моноклональные антитела против GIBsPLA2 полипептидов можно также приготовить путем конструирования комбинаторной библиотеки иммуноглобулинов, такой как библиотека фагового дисплея Fab или библиотека фагового дисплея scFv, с применением кДНК легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов, приготовленной из мРНК, извлеченной из лимфоцитов субъекта. См., например, McCafferty et al., PCT публикация WO 92/01047; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581 597; и Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725-734. Кроме того, комбинаторную библиотеку переменных областей антител можно создать путем мутации известного человеческого антитела. Например, переменную область человеческого антитела, которое, как известно, связывается с GIBsPLA2, можно подвергнуть мутации, например с применением произвольно измененных мутантных олигонуклеотидов, для генерации библиотеки мутантных переменных областей, которые можно затем подвергнуть скринингу на связывание с GIBsPLA2. Способы индукции неспецифического мутагенеза в CDR областях тяжелых и/или легких цепей иммуноглобулинов, способы скрещивания рандомизированных тяжелых и легких цепей с формированием пар, и способы скрининга можно найти, например, в Barbas et al., PCT публикация WO 96/07754; Barbas et al. (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4457-4461.

Библиотека иммуноглобулинов может быть экспрессирована посредством популяции фагового дисплея, предпочтительно выбранных из нитчатого фага, до образования библиотеки дисплея антител. Примеры способов и реагентов, особенно пригодных для применения при генерации библиотеки дисплея антител, можно найти, например, в Ladner et al. U.S. Pat. No. 5,223,409; Kang et al., PCT публикация WO 92/18619; Dower et al., PCT публикация WO 91/17271; Winter et al., PCT публикация WO 92/20791; Markland et al., PCT публикация WO 92/15679; Breitling et al., PCT публикация WO 93/01288; McCafferty et al., PCT публикация WO 92/01047; Garrard et al., PCT публикация WO 92/09690; Ladner et al., PCT публикация 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; Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; и Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982. Как только на поверхности фагов (например, нитчатого фага) экспонируются соединения, проводят скрининг библиотеки антител для идентификации и выделения тех из них, которые экспрессируют антитела, связывающие GIBsPLA2 полипептид. В предпочтительном варианте

осуществления первичный скрининг библиотеки включает пэннинг с иммобилизованным GIBsPLA2 полипептидом, и выбор тех из них, которые экспрессируют антитела, которые связывают иммобилизованный GIBsPLA2 полипептид.

В частном варианте осуществления изобретение относится к композиции, содержащей анти-GIBsPLA2 антитело (или его фрагмент или производное), и фармацевтически пригодное вспомогательное вещество.

Существующие моноклональные антитела к фосфолипазе A2-GIB включают Mab CH-7 (Labome), MAB5018 (Labome), EPR5186 (Genetex); LS-C138332 (Lifespan) или CABT-17153MH (Creative biomart). Примеры поликлональных антител включают, например, N1C3 от GeneTex. Как указано выше, предпочтительные антитела к GIBsPLA2 из настоящего изобретения связывают зрелую GIBsPLA2, еще более предпочтительно эпитоп, содержащийся в домене из GIBsPLA2, включающий аминокислоту, выбранную из аминокислоты 70, аминокислоты 121, аминокислоты 50, аминокислоты 52, аминокислоты 54, аминокислоты 71 или их комбинаций. Предпочтительные антитела из настоящего изобретения связывают эпитоп, содержащий аминокислотные остатки 50-71 из SEQ ID NO: 2, или соответствующие остатки из природного варианта SEQ ID NO: 2.

В альтернативном варианте осуществления изобретение относится к композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к GIBsPLA2 (или его фрагмент или производное), и фармацевтически пригодное вспомогательное вещество, и к ее применению.

#### Ингибирующие нуклеиновые кислоты

В альтернативном варианте осуществления ингибитор GIBsPLA2 является ингибирующей нуклеиновой кислотой, т.е. любой молекулой нуклеиновой кислоты, которая ингибирует экспрессию гена или белка GIBsPLA2. Предпочтительные ингибирующие нуклеиновые кислоты включают антисмысловые нуклеиновые кислоты, малую интерферирующую РНК (миРНК), малую шпилечную РНК (мшРНК), микроРНК, аптамеры или рибозимы. В частном варианте осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота является малой интерферирующей РНК, которая предотвращает трансляцию мРНК GIBsPLA2. В другом частном варианте осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота является антисмысловым олигонуклеотидом, предотвращающим трансляцию мРНК GIBsPLA2. В другом частном варианте осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота является малой шпилечной РНК, предотвращающей трансляцию мРНК GIBsPLA2.

миРНК содержит смысловую последовательность нуклеиновых кислот и антисмысловую последовательность нуклеиновых кислот интересующего полинуклеотида. миРНК конструируют так, чтобы единственный транскрипт (двухцепочечная РНК) имел смысловую и комплементарную антисмысловую последовательность из целевого гена. Нуклеотидная последовательность миРНК может быть сконструирована с применением компьютерной программы дизайна миРНК, доступной, например, на сайте Ambion в Интернете.

В некоторых вариантах осуществления длина антисмыслового олигонуклеотида или миРНК составляет 10 нуклеотидов или меньше. В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловых олигонуклеотидов и миРНК равна длине природного транскрипта. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды и миРНК содержат 18-30. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды и миРНК составляют меньше 25 нуклеотидов по длине.

Предпочтительная молекула ингибирующей нуклеиновой кислоты содержит домен, имеющий нуклеотидную последовательность, полностью комплементарную области гена или РНК GIBsPLA2. Такой домен содержит, как правило, от 4 до 20 нуклеотидов, обеспечивая специфическую гибридизацию и оптимальное ингибирование транскрипции гена или трансляции РНК. Последовательность ингибирующих нуклеиновых кислот может быть получена непосредственно из последовательности гена, кодирующего GIBsPLA2, такой как SEQ ID NO: 1. Альтернативно или в дополнение ингибирующие нуклеиновые кислоты могут гибридизоваться с регуляторным элементом в гене или РНК GIBsPLA2, таким как промотор, участок сплайсинга, и т.д., и предотвращать эффективную регуляцию.

Специфические примеры ингибирующих молекул нуклеиновой кислоты из настоящего изобретения включают изолированные молекулы одноцепочечной нуклеиновой кислоты, состоящие из 10-50 последовательных нуклеотидов из SEQ ID NO: 1. Специфическими примерами ингибирующих молекул нуклеиновой кислоты из настоящего изобретения являются антисмысловые нуклеиновые кислоты, состоящие из следующей нуклеотидной последовательности или полностью комплементарной ей цепи:

ATGAAACTCCTTGTGCTAG (SEQ ID NO: 3)

ACAGCGGCATCAGC (SEQ ID NO: 4)

TTCCGCAAATGATCAA (SEQ ID NO: 5)

CCCGGGGAGTGACCCC (SEQ ID NO: 6)

TACGGCTGCTACTGTGGCTT (SEQ ID NO: 7)

GACACATGACAACCTGCTACGACC (SEQ ID NO: 8)

ACCCACACCTATTCATACTCGT (SEQ ID NO: 9)

ATCACCTGTAGCAGCA (SEQ ID NO: 10)

AGCTCCATATAACAAGGCA (SEQ ID NO: 11)

CAAGAAGTATTGTCAGAG (SEQ ID NO: 12)

#### Пептидные и низкомолекулярные лекарства

В альтернативном варианте осуществления ингибитор GIBsPLA2 является пептидным или низкомолекулярным лекарством, которое ингибирует активность GIBsPLA2. Пептидное или низкомолекулярное лекарство, как правило, является молекулой, избирательно связывающейся с GIBsPLA2, или субстратом GIBsPLA2, или кофактором GIBsPLA2, или продуктом деградации или метаболитом пути GIBsPLA2.

Пептиды предпочтительно содержат от 3 до 20 аминокислотных остатков, а их последовательность может быть идентична домену GIBsPLA2 (пептиду-приманке) или домену субстрата, кофактора, продукта деградации или метаболита GIBsPLA2. Предпочтительные пептиды из настоящего изобретения содержат от 4 до 30 последовательных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 2 (или соответствующей последовательности из природного варианта SEQ ID NO: 2). Наиболее предпочтительные пептиды из настоящего изобретения содержат от 5 до 25 последовательных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 2 (или соответствующей последовательности из природного варианта SEQ ID NO: 2) и дополнительно содержат по меньшей мере один из следующих аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 2 (или соответствующей последовательности из природного варианта SEQ ID NO: 2): аминокислоту 70, аминокислоту 121, аминокислоту 50, аминокислоту 52, аминокислоту 54, аминокислоту 71 или их комбинацию. Специфическими примерами пептидов из настоящего изобретения являются пептиды из менее чем 25 аминокислот, содержащие любую из следующих последовательностей:

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)

DRNAAICFSKAPYNKANKNL (SEQ ID NO: 21)

Пептиды из настоящего изобретения могут включать пептидные, не пептидные и/или модифицированные пептидные связи. В частном варианте осуществления пептиды включают по меньшей мере одну пептидомиметическую связь, выбранную из интеркаляции метиленовой (-CH<sub>2</sub>-) или фосфатной (-PO<sub>2</sub>-) группы, вторичного амина (-NH-) или кислорода (-O-), альфа-азапептидов, альфа-алкилпептидов, N-алкилпептидов, фосфонамидатов, депсипептидов, гидроксиметиленов, гидроксипетиленов, дигидроксипетиленов, гидроксипетиламинов, ретро-инверсо-пептидов, метиленокси, цетометиленов, сложных эфиров, фосфинатов, фосфинов, или фосфонамидов. Кроме того, пептиды могут содержать защищенный N-и/или C-конец, например путем ацилирования и/или амидирования и/или этерификации.

Пептиды из настоящего изобретения могут быть получены путем методик, известных в данной области техники, таких как химический, биологический и/или генетический синтез.

Каждый из этих пептидов в изолированной форме представляет конкретный объект настоящего изобретения.

Предпочтительные низкомолекулярные лекарства являются углеводородными соединениями, которые избирательно связываются с GIBsPLA2.

Низкомолекулярные лекарства и пептиды предпочтительно получают посредством способа, включающего (i) обеспечение контакта тестируемого соединения с GIBsPLA2 или ее фрагментом, (ii) выбор тестируемого соединения, которое связывается с GIBsPLA2 или ее указанным фрагментом, и (iii) выбор соединения из пункта (ii), которое ингибирует активность GIBsPLA2. Такой способ представляет конкретный объект настоящего изобретения.

Низкомолекулярные лекарства и пептиды также предпочтительно получают посредством способа, включающего (i) обеспечение контакта тестируемого соединения с субстратом, кофактором, или продуктом деградации GIBsPLA2 или ее фрагментом, (ii) выбор тестируемого соединения, которое связывается с указанным субстратом, кофактором, или продуктом деградации GIBsPLA2, или ее фрагментом, и (iii)

выбор соединения из пункта (ii), которое ингибирует активность GIBsPLA2. Такой способ представляет конкретный объект настоящего изобретения.

#### Растворимые рецепторы GIBsPLA2

В альтернативном варианте осуществления ингибитор GIBsPLA2 является растворимой формой рецептора GIBsPLA2. Такие соединения, являющиеся растворимыми рецепторами, способны связывать GIBsPLA2, таким образом, ингибируя ее активность, действуя в качестве приманки или маскирующего агента.

В специфическом варианте осуществления такие ингибиторы являются растворимой формой человеческого или мышинового рецептора GIBsPLA2, или его фрагмента, связывающего GIBsPLA2.

Аминокислотные последовательности мышинных и человеческих растворимых рецепторов представлены в SEQ ID NO: 22 и 23 соответственно. Таким образом, термин "растворимый рецептор" охватывает любой GIBsPLA2-связывающий полипептид, включающий всю последовательность SEQ ID NO: 22 и 23 или ее фрагмент.

GIBsPLA2-связывающий фрагмент означает любой фрагмент такого полипептида, включающий предпочтительно по меньшей мере 5 его последовательных аминокислотных остатков, более предпочтительно по меньшей мере 8, 10 или 12, который специфически связывает PLA2GIB. Специфическое связывание молекулы рецептора указывает, что молекула рецептора связывается с PLA2GIB с более высокой аффинностью (например, по меньшей мере 5-кратной), чем с PLA2-IIA или IID. Фрагмент, как определено выше, наиболее предпочтительно включает менее 50 аминокислотных остатков.

Примерами GIBsPLA2-связывающих полипептидов являются, без ограничения, полипептиды, включающие по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей:

LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYINKW (SEQ ID NO: 24)  
 WEKDLNSHICYQFNLLS (SEQ ID NO: 25)  
 DCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEK (SEQ ID NO: 26)  
 QYKVQVKSDNTVVARQIHRWIAYTSSGGDICE (SEQ ID NO: 27)  
 LSYLNWSQEITPGPFVEHHC GTLEVVSA (SEQ ID NO: 28)  
 SRFEQAFITSLISSVAEKDSYFW (SEQ ID NO: 29)  
 WICRIPRDVRPKFPDWYQYDAPWLFYQNA (SEQ ID NO: 30)  
 AFHQAFLTVLLSRLGHTHWIGLSTTDNGQT (SEQ ID NO: 31)

SEQ ID NO: 24-26 получены из последовательности человеческого растворимого рецептора PLA2GIB, в то время как SEQ ID NO: 27-31 получены из последовательности мышинового растворимого рецептора PLA2GIB.

#### Вакцинация

В альтернативном (или кумулятивном) варианте осуществления ингибирование GIBsPLA2 у субъекта достигается путем вакцинации (или иммунизации) субъекта GIBsPLA2 антигеном. В результате такой вакцинации или иммунизации субъект вырабатывает антитела (или клетки), которые ингибируют GIBsPLA2. В частности, инъекция(и) GIBsPLA2 антигена (например, иммуногенной GIBsPLA2, по существу лишенной биологической активности) обеспечивает генерацию антител у субъекта, получающего лечение. Эти антитела будут защищать против избытка экспрессии GIBsPLA2 и могут применяться в качестве иммунотерапии или вакцинопрофилактики.

Таким образом, задачей настоящего изобретения является способ вакцинации субъекта, включающий применение у субъекта GIBsPLA2 антигена.

Другой задачей изобретения является GIBsPLA2 антиген для применения с целью вакцинации субъекта, нуждающегося в этом.

В частном варианте осуществления GIBsPLA2 антиген, используемый для вакцинации, является инактивированной иммуногенной молекулой, индуцирующей иммунный ответ против GIBsPLA2 у субъекта. Инактивация может быть достигнута, например, путем химического или физического изменения GIBsPLA2, или путем мутации или усеченным белком, или тем и другим; а иммуногенность может быть достигнута в результате инактивации и/или путем дополнительной конъюгации белка с подходящим носителем или гаптеном, таким как KLH, HSA, полилизин, вирусный анатоксин, или тому подобное, и/или путем полимеризации, или тому подобного. Таким образом, антиген может быть химически или физически модифицирован, например для улучшения его иммуногенности.

В предпочтительном варианте осуществления GIBsPLA2 антиген из настоящего изобретения включает GIBsPLA2 или ее эпитоп-содержащий фрагмент или мимотоп.

В частном варианте осуществления GIBsPLA2 антиген содержит полноразмерный GIBsPLA2 белок. В другом частном варианте осуществления GIBsPLA2 антиген содержит белок, включающий SEQ ID

NO: 2, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 2.

В альтернативном варианте осуществления GIBsPLA2 антиген содержит фрагмент GIBsPLA2 белка, включающий по меньшей мере 6 последовательных аминокислотных остатков и содержащий иммуногенный эпитоп или его мимотоп. В предпочтительном варианте осуществления GIBsPLA2 антиген включает по меньшей мере 6-20 аминокислотных остатков. Предпочтительные пептиды из настоящего изобретения содержат от 4 до 30 последовательных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 2 (или соответствующей последовательности из природного варианта SEQ ID NO: 2). Наиболее предпочтительные пептиды из настоящего изобретения включают от 5 до 25 последовательных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 2 (или соответствующей последовательности из природного варианта SEQ ID NO: 2) и, кроме того, содержат по меньшей мере один из следующих аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 2 (или соответствующей последовательности из природного варианта SEQ ID NO: 2): аминокислоту 70, аминокислоту 121, аминокислоту 50, аминокислоту 52, аминокислоту 54, аминокислоту 71 или их комбинацию. Специфическими примерами пептидов из настоящего изобретения являются пептиды из менее чем 50 аминокислот, содержащие любые из следующих последовательностей:

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)

DRNAAICFSKAPYNKANKNL (SEQ ID NO: 21).

GIBsPLA2 антиген может быть в различных формах, такой как в свободной форме, полимеризованным, химически или физически модифицированным, и/или сцепленным (т.е. связанным) с молекулой - носителем. Сцепление с носителем может повышать иммуногенность и (дополнительно) подавлять биологическую активность GIBsPLA2 полипептида. В связи с этим молекула-носитель может быть любой молекулой-носителем или белком, обычно применяемым в иммунологии, например, таким как KLN (гемоцианин лимфы улитки), овальбумин, бычий сывороточный альбумин (BSA), вирусный или бактериальный анатоксин, такой как столбнячный анатоксин, дифтерийный токсин, В-субъединица холерного токсина, их мутанты, такие как дифтерийный токсин CRM 197, везикулярный белок наружной мембраны, молекула полилизина, или вирусоподобная частица (VLP). В предпочтительном варианте осуществления носителем является KLN или CRM197 или VLP.

Сцепление GIBsPLA2 с носителем можно выполнять посредством ковалентной химии, с применением связывающих химических групп или реакций, например, таких как глутаральдегид, биотин и т.д. Предпочтительно конъюгат или GIBsPLA2 белок или фрагмент или мимотоп подвергают обработке формальдегидом для полной инактивации GIBsPLA2.

В частном варианте осуществления GIBsPLA2 антиген включает полноразмерный GIBsPLA2 белок, факультативно сцепленный с белком-носителем. В предпочтительном варианте осуществления GIBsPLA2 антиген включает белок, содержащий SEQ ID NO: 2, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 2, связанную с белком-носителем.

В другом частном варианте осуществления GIBsPLA2 антиген содержит иммуногенный пептид или мимотоп из GIBsPLA2, факультативно сцепленный с белком-носителем. В более предпочтительном варианте осуществления GIBsPLA2 антиген содержит полипептид длиной по меньшей мере 10 аминокислот, содержащий по меньшей мере один из следующих аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 2 (или из соответствующей последовательности природного варианта SEQ ID NO: 2): аминокислоту 70, аминокислоту 121, аминокислоту 50, аминокислоту 52, аминокислоту 54, аминокислоту 71 или их комбинацию, факультативно сцепленную с молекулой-носителем.

Иммуногенность GIBsPLA2 антигена можно тестировать различными способами, такими как посредством иммунизации животного, не являющегося человеком, которому пересаживали человеческие иммунные клетки, с последующей проверкой присутствия антител, или посредством сэндвич-ИФА с применением человеческих или гуманизированных антител. Отсутствие биологической активности можно подтвердить посредством любого из анализов активности, описанного в заявке. В предпочтительном варианте осуществления GIBsPLA2 антиген имеет меньше 20%, более предпочтительно меньше 15, 10, 5 или даже 1% активности GIBsPLA2 белка дикого типа в методе (i) индукции образования мембранных микродоменов ММД в CD4 Т-клетках или (ii) в индукции резистентности CD4 Т-клеток к сигналам IL-2 или резистентности к сигналам IL-7.



В частном варианте осуществления изобретение относится к инактивированной и иммуногенной GIBsPLA2.

В другом частном варианте осуществления изобретение относится к GIBsPLA2 белку, или его фрагменту, или мимотопу, конъюгированному с молекулой-носителем, предпочтительно KLH.

В другом аспекте изобретение относится к вакцине, содержащей GIBsPLA2 антиген, подходящее вспомогательное вещество, и факультативно подходящий адъювант.

Такие молекулы и конъюгаты и вакцины представляют мощные агенты для применения с целью иммунизации субъектов, с обеспечением длительного ингибирования GIBsPLA2. При повторении такие методы можно применять для индукции постоянного ингибирования GIBsPLA2.

Другой объект настоящего изобретения относится к способу индукции выработки антител, нейтрализующих активность эндогенной GIBsPLA2 у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает применение у указанного субъекта терапевтически эффективного количества GIBsPLA2 антигена или вакцины.

Применение антигена или вакцины из настоящего изобретения можно осуществлять любым подходящим путем, таким как посредством инъекции, предпочтительно внутримышечной, подкожной, трансдермальной, внутривенной или интраартериальной; или путем интраназального, перорального, мукозального или ректального применения.

GIBsPLA2 антиген или вакцину можно применять для лечения любого заболевания, связанного с избыточной продукцией GIBsPLA2. В частности, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, связанного с избыточной продукцией GIBsPLA2 у субъекта, нуждающегося в этом, включающему применение у субъекта терапевтически эффективного количества GIBsPLA2 антигена или вакцинной композиции, содержащей GIBsPLA2 антиген.

#### Агонисты или активаторы GIBsPLA2

Термин "агонист" GIBsPLA2 в контексте настоящего изобретения охватывает любое вещество, обладающее, или опосредующее, или осуществляющее повышающую регуляцию активности GIBsPLA2, такое как, без ограничения, пептид, полипептид, рекомбинантный белок, конъюгат, природный или искусственный лиганд, продукт деградации, гомолог, нуклеиновая кислота, ДНК, РНК, аптамер, и т.д., или их комбинация. Термин "агонист" охватывает как полные, так и частичные агонисты. Частным примером GIBsPLA2 агониста является GIBsPLA2 белок или нуклеиновая кислота, кодирующая GIBsPLA2 белок.

В частном варианте осуществления изобретение относится к способам ингибирования иммунного ответа у субъекта, включающим применение у субъекта GIBsPLA2 белка или нуклеиновой кислоты, кодирующей GIBsPLA2 белок.

#### Композиции

Изобретение также относится к композициям, включающим GIBsPLA2 модулятор или антиген, как описано в настоящем изобретении, в качестве активного ингредиента, и предпочтительно фармацевтически пригодный носитель.

"Фармацевтическая композиция" означает композицию из соединения из настоящего изобретения (активного ингредиента) и среды, как правило, принятой в данной области техники для доставки биологически активных соединений субъекту, нуждающемуся в этом. Такой носитель включает все фармацевтически пригодные носители, разбавители, среды или подложки. Может применяться обычная фармацевтическая практика для обеспечения подходящих составов или композиций для субъекта, например в лекарственной форме.

Соединения или композиции в соответствии с изобретением могут быть представлены в форме мази, пасты, жидких растворов, суспензий, таблеток, желатиновых капсул, капсул, суппозитория, порошков, капель для носа, или аэрозоля, предпочтительно в форме раствора или суспензии для инъекций. Для инъекций соединения, как правило, пакуют в форме жидких суспензий, которые можно вводить, например, посредством шприца или путем перфузии. В связи с этим соединения обычно растворяют в солевых, физиологических, изотонических или буферных растворах, совместимых с фармацевтическим применением и известных специалисту в данной области техники. Таким образом, композиции могут содержать один или несколько агентов или вспомогательных веществ, выбранных из диспергирующих средств, солюбилизаторов, стабилизаторов, консервантов и т.д. Агентами или вспомогательными веществами, которые можно применять в жидких и/или предназначенных для инъекций рецептурах, являются в особенности метилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, полисорбат 80, маннитол, желатин, лактоза, растительные масла, аравийская камедь и т.д. Носитель может также быть выбран, например из метил-бета-циклодекстрина, полимера акриловой кислоты (такого, как карбопол), смеси полиэтиленгликоля и пропиленгликоля, моноэтаноламина и гидроксиметилцеллюлозы.

Композиции, как правило, содержат эффективное количество соединения из настоящего изобретения, например, количество, которое эффективно для модуляции GIBsPLA2. Как правило, композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат примерно от 1 мкг до 1000 мг GIBsPLA2 модулятора, такое количество как 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 и 50-100 мг, например от 0,05 до 100 мг, предпочтительно от 0,05 до 5 мг, например 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 2; 3; 4 или 5 мг. Дозировку может регулировать специалист в данной области

техники, в зависимости от модулятора и заболевания.

Композиции из настоящего изобретения могут дополнительно включать одно или несколько дополнительных активных соединений, для одновременного или последовательного применения.

Изобретение также относится к способу приготовления фармацевтической композиции, включающему смешивание модулятора GIBsPLA2, как описано выше, и фармацевтически пригодного вспомогательного вещества, и получение композиции в любой подходящей форме или контейнере (шприце, ампуле, флаконе, бутылке, пакете и т.д.).

Изобретение также относится к набору, включающему (i) композицию, содержащую модулятор GIBsPLA2, как описано выше, (ii) по меньшей мере один контейнер и факультативно (iii) письменные инструкции по применению набора.

#### Заболевания

Соединения и композиции из настоящего изобретения можно применять для лечения любого заболевания, связанного с неадекватным (например, дефектным или неподходящим) иммунным ответом, в частности неадекватной активностью CD4 Т-клеток, а также любого заболевания, где повышенный иммунитет может облегчить состояние субъекта. Эти заболевания иногда обозначаются как "иммунные расстройства" в настоящем изобретении. Они включают иммунодефицитные состояния (например, вызванные вирусной инфекцией, патогенной инфекцией, раком, и т.д.), аутоиммунные заболевания, трансплантацию, диабет, воспалительные заболевания, онкологические заболевания, аллергию, астму, псориаз, крапивницу, экзему и тому подобное.

#### Иммунодефициты и связанные с ними заболевания

В первом аспекте изобретение основано на ингибировании GIBsPLA2 у субъекта, с повышением или восстановлением иммунной активности, в частности активности, опосредованной CD4-Т-клетками.

Таким образом, в частном варианте осуществления изобретение направлено на способы стимуляции иммунного ответа субъекта, нуждающегося в этом, включающие ингибирование GIBsPLA2 у указанного субъекта.

В частном варианте осуществления изобретение направлено на способы модуляции белых кровяных клеток у субъекта, нуждающегося в этом, включающие ингибирование GIBsPLA2 у указанного субъекта.

Примерами заболеваний, при которых могут быть полезными ингибиторы GIBsPLA2, являются все заболевания с иммунодефицитом, такие как ВИЧ-опосредованный иммунодефицит. В связи с этим в частном варианте осуществления изобретение направлено на способы лечения иммунодефицита или связанного с ним нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающие ингибирование GIBsPLA2 у указанного субъекта.

В другом частном варианте осуществления изобретение направлено на ингибитор GIBsPLA2 для применения с целью лечения иммунодефицита или связанного с ним нарушения у субъекта, нуждающегося в этом.

Иммунодефициты и связанные с ними нарушения означают любое состояние или патологию, характеризующиеся и/или вызванные снижением иммунной функции или ответа у субъекта. Иммунодефициты могут быть вызваны, например, вирусной инфекцией (например, ВИЧ, гепатитом В и т.д.), бактериальной инфекцией, раком, или другими патологическими состояниями. Таким образом, термин "нарушение, связанное с иммунодефицитом" означает любое заболевание, вызванное или связанное с иммунодефицитом. Изобретение особо пригодно для лечения иммунодефицитов, связанных с CD4 Т-клетками, и связанных с ними заболеваний. Настоящая заявка действительно демонстрирует, что биологические эффекты GIBsPLA2 вовлечены в CD4 Т-клеточное патологическое состояние. Соответственно блокада активности GIBsPLA2 оказывает терапевтическое влияние у субъектов с нарушением ответа на цитокины, вызванным иммунодефицитом, как часто наблюдается у пациентов, инфицированных ВИЧ.

Соответственно в частном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения ВИЧ инфекции у субъекта путем ингибирования GIBsPLA2 у субъекта, предпочтительно путем применения GIBsPLA2 ингибитора или вакцины у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект является ВИЧ-инфицированным пациентом на ранней стадии заболевания, и способы приводят к повышению вероятности того, что пациент сможет контролировать ВИЧ. В некоторых вариантах осуществления субъект является пациентом с низким восстановлением иммунитета после антиретровирусного лечения, и/или с тяжелой идиопатической CD4 Т-лимфопенией (ICL). Изобретение также относится к способу повышения CD4-Т-клеточной активности у ВИЧ-инфицированного субъекта путем ингибирования GIBsPLA2 у субъекта, предпочтительно путем применения GIBsPLA2 ингибитора или вакцины у субъекта.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способам лечения острого и/или хронического воспаления и процесса в результате воспалительных реакций у субъекта, путем введения GIBsPLA2 субъекту, непосредственно или вместе с противовоспалительными лекарствами.

Изобретение также обеспечивает способы лечения рака путем повышения иммунного ответа у субъекта, включающие ингибирование GIBsPLA2 у субъекта, предпочтительно путем применения GIBsPLA2 ингибитора или вакцины у субъекта. Изобретение также обеспечивает способы лечения иммунодефицита, связанного с CD4 Т-клетками, ассоциированного с раком у субъекта, путем ингибирования GIB-

sPLA2 у субъекта, предпочтительно путем применения GIBsPLA2 ингибитора или вакцины у субъекта.

Патологический иммунный ответ и связанные с ним заболевания

Изобретение можно применять для лечения любого заболевания, связанного с неадекватным (например, патологическим или несоответствующим) иммунным ответом или с нежелательной (гипер)активностью или (гипер)активацией иммунной системы, в частности с неадекватной активностью CD4 T-клеток. Эти заболевания включают, например, аутоиммунные заболевания, трансплантацию, диабет, аллергию, астму, псориаз, крапивницу, экзему и тому подобное.

Таким образом, в другом аспекте изобретение основано на активации или индукции GIBsPLA2 у субъекта, с ингибированием иммунной активности, в частности, активности, опосредованной CD4-T-клетками.

Таким образом, в частном варианте осуществления изобретение направлено на способы ингибирования иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающие индукцию или активацию GIBsPLA2 у указанного субъекта.

В частном варианте осуществления изобретение направлено на способы ингибирования белых кровяных клеток у субъекта, нуждающегося в этом, включающие ингибирование GIBsPLA2 у указанного субъекта.

В другом частном варианте осуществления изобретение направлено на способы лечения расстройства, вызванного нежелательным иммунным ответом у субъекта, нуждающегося в этом, включающие индукцию или активацию GIBsPLA2 у указанного субъекта.

Индукция или активация GIBsPLA2 у субъекта предпочтительно включает применение у субъекта агониста GIBsPLA2, например, GIBsPLA2 белка или его функционального фрагмента.

В другом частном варианте осуществления изобретение направлено на GIBsPLA2 агонист или активатор для применения в лечении нарушения, вызванного нежелательным иммунным ответом, у субъекта, нуждающегося в этом.

Примерами заболеваний, при которых могут применяться GIBsPLA2 агонисты, являются аутоиммунные нарушения, рак, вирусные заболевания, бактериальные инфекции, и т.д.

В частном варианте осуществления изобретения направлено на способы лечения аутоиммунного нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающие стимуляцию или индукцию GIBsPLA2 у указанного субъекта.

В другом частном варианте осуществления изобретение направлено на соединение или композицию из настоящего изобретения для применения в лечении аутоиммунного нарушения у субъекта, нуждающегося в этом.

В частном варианте осуществления изобретение направлено на способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающие стимуляцию или индукцию GIBsPLA2 у указанного субъекта.

В другом частном варианте осуществления изобретение направлено на соединение или композицию из изобретения для применения в лечении рака у субъекта, нуждающегося в этом.

Другой частный вариант осуществления изобретения относится к способу лечения (например, снижения или профилактики или ингибирования) отторжения трансплантата, для лечения болезни трансплантат против хозяина у субъекта, которому проведена трансплантация, включающему стимуляцию или индукцию GIBsPLA2 у указанного субъекта. Другим объектом настоящего изобретения является способ улучшения толерантности к аллогенному трансплантату у субъекта, включающий стимуляцию или индукцию GIBsPLA2 у указанного субъекта.

Противомикробная активность

Настоящая заявка также обеспечивает, в другом аспекте, способ уничтожения микроорганизмов с применением GIBsPLA2. Путем прямого воздействия на мембраны, GIBsPLA2 может разрушать или убивать бактерии, вирусы с оболочкой, паразитов и тому подобное.

При острых инфекциях или других инфекциях GIBsPLA2 можно применять по отдельности или вместе с антибиотиками, противовирусными, антиретровирусными и противопаразитарными препаратами. В случае микробов, резистентных к известным противомикробным лекарствам, GIBsPLA2 может представлять альтернативную терапию. Ее можно применять в очень кратковременном лечении, например при очень опасных и острых клинических ситуациях.

Специфическими примерами заболеваний, при которых может быть полезным лечение GIBsPLA2 в соответствии с изобретением, являются все клинические ситуации с гиперактивностью иммунной системы или хроническим воспалением, такие как рассеянный склероз, миастения гравис; аутоиммунные нейропатии, такие как синдром Гийена-Барре; аутоиммунный увеит, увеит, аутоиммунная гемолитическая анемия, пернициозная анемия, аутоиммунная тромбоцитопения, височный артериит, антифосфолипидный синдром; васкулиты, такие как гранулематоз Вегенера; болезнь Бехчета, атеросклероз, псориаз, герпетиформный дерматит, вульгарный пемфигус, витилиго, грибовидный микоз, аллергический контактный дерматит, атопический дерматит, красный плоский лишай, острый лихеноидный и вариолиформный параспориоз, экзема, болезнь Крона, язвенный колит, первичный билиарный цирроз, аутоиммунный гепатит, сахарный диабет 1 типа, болезнь Аддисона, базедова болезнь, тиреоидит Хашимото, аутоиммунный оофорит и орхит, аутоиммунный тиреоидит, ревматоидный артрит, системная красная волчанка,

склеродермия, полимиозит, дерматомиозит; спондилоартропатии, такие как анкилозирующий спондилит или синдром Шегрена.

Продолжительность, дозировки и частота применения соединений или композиций из настоящего изобретения могут быть адаптированы в соответствии с субъектом и заболеванием. Лечение может проводиться по отдельности или в комбинации с другими активными ингредиентами, одновременно, или отдельно, или последовательно.

Соединения или композиции в соответствии с изобретением можно применять различными путями или способами, такими как, без ограничения, системное введение, внутримышечное, внутривенное, интраперитонеальное, кожное, подкожное, дермальное, трансдермальное, интратекальное, окулярное (например, корнеальное), или ректальное, или путем местного применения в участке воспаления, и предпочтительно путем внутримышечного или внутривенного введения.

Типичный режим включает единичное или повторное применение эффективного количества модулятора GIBsPLA2 в течение периода от одного до нескольких дней, до одного года, и включая период от одной недели примерно до шести месяцев. Необходимо понять, что дозировка фармацевтического соединения или композиции из настоящего изобретения, применяемая *in vivo*, будет зависеть от возраста, состояния здоровья, пола и массы тела реципиента (субъекта), вида сопутствующего лечения, если оно проводится, частоты лечения, и природы необходимого фармацевтического эффекта. Диапазоны эффективных доз, обеспеченные в настоящем изобретении, не предназначены для ограничения и представления предпочтительных диапазонов доз. Однако наиболее предпочтительная дозировка должна быть адаптирована к определенному субъекту, как понятно и может быть определено любым специалистом в данной области техники (см., например, Berkow et al, eds., "The Merck Manual, 16<sup>th</sup> edition", Merck and Co., Rahway, N.J., 1992 ("Руководство Merck, 16-е издание"); Goodman et al., eds., Goodman и Gilman's "The pharmacological Basis of Therapeutics, 10<sup>th</sup> edition", Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (2001) ("Фармакологическая основа терапевтических средств")).

#### Диагностика

Изобретение также обеспечивает способы детекции иммунного дефекта у субъекта на основе детекции присутствия или количества, или отсутствия GIBsPLA2 в образце от субъекта. Способ из настоящего изобретения можно осуществлять с применением различных технологий или платформ детекции, известных как таковые в данной области техники, таких как, без ограничения, анализ с применением захвата, сэндвич-анализ, конкурентный анализ, радиоиммунный анализ; ферментативные метки с субстратами, генерирующими окрашенные, флуоресцентные, хемилюминесцентные или электрохимически активные продукты; флуоресценция, флуоресцентная поляризация, хемилюминесценция, оптический и колориметрический анализ, электрохемилюминесценция, флуоресценция с временным разрешением, поверхностный плазмонный резонанс, анализ с применением затухающей волны, анализ на многолуночных планшетах (ИФА), индивидуальный анализ, многоканальный анализ, многоканальный анализ на латексных бусах, многоканальный анализ на микроматрице (на плоской поверхности), анализ на стеклянных пластинах или анализ на основе полосок.

В частном варианте осуществления способ включает определение присутствия или количества, или отсутствия полиморфизма GIBsPLA2 гена, РНК или белка. Наши результаты показали, что GIBsPLA2 имеет высокий полиморфизм и что это коррелирует с физиологическим статусом субъекта. Таким образом, изобретение включает (i) определение присутствия, количества или отсутствия конкретной полиморфной изоформы GIBsPLA2, и/или (ii) определение общего уровня полиморфизма GIBsPLA2 у субъекта, где указанные данные коррелируют с физиологическим статусом субъекта. В частности, специфические изоформы могут быть характеристикой предрасположенности, присутствия или развития у субъекта заболевания, как описано выше. Такое определение можно также использовать в персонализированной медицине, для регуляции лечения.

#### Способы мониторинга и/или диагностики иммунодефицита, связанного с дефектами CD4 Т-клеток, включающий детекцию GIBsPLA2

Способы мониторинга и/или диагностики иммунодефицита, связанного с дефектами CD4 Т-клеток, в частности, инфекции вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта, обеспечиваются в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) обеспечение образца, содержащего жидкость организма, предпочтительно плазму от субъекта, и (b) детекцию уровня GIBsPLA2 в образце выше пороговой. Присутствие GIBsPLA2 в образце можно выявить любым способом, известным в данной области техники, например способом, включающим ферментативный анализ, анализ с захватом лиганда и/или иммуноанализ.

В некоторых вариантах осуществления способ включает получение образца, включающего плазму, от субъекта, и определение того, имеет ли плазма по меньшей мере одну активность, выбранную из индукции образования аномальных мембранных микродоменов (ММД) в CD4 Т-клетках от здоровых субъектов и индукции резистентности CD4 Т-клеток от здоровых субъектов к сигналам интерлейкина-7 (IL-7). Если плазма субъекта имеет такую активность, то субъект в некоторых вариантах осуществления определяется как имеющий связанный с CD4 Т-клетками иммунодефицит, который часто наблюдается у ВИЧ-инфицированных пациентов, но не только у них. Если фракция плазмы не содержит такую актив-

ность, то субъект в некоторых вариантах осуществления определяется как имеющий низкую подверженность иммунодефициту, связанному с нарушением CD4 Т-клеток в цитокин-регулируемом гомеостазе.

В некоторых вариантах осуществления субъект определяется как имеющий ВИЧ-инфекцию. Напротив, если белковая фракция не содержит такой активности, то субъект в некоторых вариантах осуществления определяется как не имеющий иммунодефицита, связанного с дефектами CD4 Т-клеток, как раскрыто в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления субъект определяется как не имеющий ВИЧ-инфекции.

В некоторых вариантах осуществления способы включают обеспечение контакта образца, содержащего жидкость организма, предпочтительно плазму, от субъекта, с антителами, специфичными к GIBsPLA2, и определение присутствия или отсутствия иммунной реакции. В некоторых вариантах осуществления присутствие или отсутствие иммунной реакции определяют посредством способа, включающего иммуноферментный анализ (ИФА). Наличие иммунной реакции между антителом, специфичным к GIBsPLA2, и образцом указывает на присутствие GIBsPLA2 в образце, что в свою очередь указывает, что субъект имеет иммунодефицит, связанный с дефектами CD4 Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления определяется, что субъект имеет ВИЧ-инфекцию. Напротив, отсутствие иммунной реакции между антителом, специфичным к GIBsPLA2, и образцом указывает, что субъект не имеет иммунодефицита, связанного с дефектами CD4 Т-клеток, как раскрыто в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления определяется, что субъект не имеет ВИЧ инфекции.

В некоторых вариантах осуществления анализ на присутствие GIBsPLA2 в образце является качественным. В некоторых вариантах осуществления анализ на присутствие GIBsPLA2 в образце является количественным.

В некоторых вариантах осуществления способ включает сравнение результатов анализа с результатами схожего анализа контрольного образца, содержащего плазму субъекта, у которого нет иммунодефицита, связанного с дефектами CD4 Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают сравнение результатов анализа с результатами подобного анализа образца, содержащего плазму того же самого субъекта, собранную раньше.

Способы мониторинга и/или диагностики иммунодефицита,  
связанного с изменением CD4 Т-клеток, включающие  
характеристику мембранных микродоменов на CD4 Т-клетках

Данные в примерах показывают, что у ВИЧ-инфицированных пациентов отмечается образование характерных мембранных микродоменов (ММД) на поверхности CD4 Т-клеток, хотя очень мало клеток действительно инфицировано ВИЧ.

Соответственно настоящее изобретение также обеспечивает способы диагностики иммунодефицита, связанного с изменением CD4 Т-клеток, например, такого как иммунодефицит, вызванный инфекцией вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) выделение CD4 Т-лимфоцитов у субъекта и (b) измерение числа и/или размера мембранных микродоменов (ММД) на Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают по меньшей мере одно из (с) измерения количества фосфо-STAT5 в Т-клетках и (d) определения доли импорта в ядро фосфо-STAT5 в Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления число и/или размер ММД на Т-клетках измеряют при отсутствии интерлейкина. В некоторых вариантах осуществления число и/или размер ММД на Т-клетках измеряют при отсутствии IL-2. В некоторых вариантах осуществления число и/или размер ММД на Т-клетках измеряют при отсутствии IL-7. В некоторых вариантах осуществления число и/или размер ММД на Т-клетках измеряют в присутствии субпорогового уровня интерлейкина.

В некоторых вариантах осуществления, если число ММД на Т-клетках, выделенных у субъекта, находится, по меньшей мере, на пороговом уровне, это указывает, что субъект имеет иммунодефицит, связанный с изменением CD4 Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления это указывает, что субъект имеет ВИЧ инфекцию. В некоторых вариантах осуществления, если число ММД на Т-клетках, выделенных у субъекта, не находится по меньшей мере на пороговом уровне, это указывает, что субъект не имеет иммунодефицита, связанного с изменением CD4 Т-клеток, как раскрыто в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления это означает, что субъект не имеет нарушений ответа CD4 Т-клеток на сигналы цитокинов. В некоторых вариантах осуществления это означает, что субъект не имеет нарушения ответа CD4 Т-клеток на интерлейкин-7. В некоторых вариантах осуществления это указывает, что субъект не имеет ВИЧ инфекции. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень составляет по меньшей мере примерно 80 на клетку, по меньшей мере примерно 90 на клетку, по меньшей мере примерно 100 на клетку, по меньшей мере примерно 110 на клетку или по меньшей мере примерно 120 на клетку. В не ограничивающем предпочтительном варианте осуществления пороговый уровень составляет примерно 100 на клетку. В некоторых вариантах осуществления, если ММД на Т-клетках, выделенных у субъекта, имеют диаметр по меньшей мере порогового уровня, это указывает, что субъект имеет ВИЧ-инфекцию. В некоторых вариантах осуществления, если ММД на Т-клетках, выделенных у субъекта, не имеют диаметр по меньшей мере порогового уровня, это указывает, что субъект не имеет нарушения ответа к интерлейкин-7 и в более широком смысле на цитокины. В некоторых вариантах осуще-

ствления это указывает, что субъект не имеет ВИЧ-инфекцию. В некоторых вариантах осуществления пороговым уровням является диаметр по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 110 нм, по меньшей мере 120 нм, по меньшей мере 130 нм, или по меньшей мере 140 нм. В не ограничивающем предпочтительном варианте осуществления пороговым уровнем является диаметр по меньшей мере 120 нм.

Поскольку RIF может менять способность CD4 Т-клеток к ответу на IL-7 путем агрегации мембранных рецепторов в аномально большие ММД, могут подвергаться изменению ответы на другие гамма-с и цитокины, а также RIF может быть связан с другими патологиями, при которых вовлечен измененный ответ CD4 Т-клеток.

#### Способы идентификации потенциальных терапевтических агентов

Настоящее изобретение также обеспечивает способы идентификации потенциального терапевтического агента, включающий (а) обеспечение контакта CD4 Т-лимфоцитов с GIBsPLA2 в присутствии агента и (b) измерение GIBsPLA2-индуцированной активации CD4 Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают (с) сравнение уровня GIBsPLA2-индуцированной активации CD4 Т-клеток в присутствии агента с уровнем GIBsPLA2-индуцированной активации CD4 Т-клеток при отсутствии агента, то агент идентифицируют как потенциальный агент для лечения иммунодефицита. В некоторых вариантах осуществления агент идентифицируют как потенциальный агент для лечения ВИЧ. В некоторых вариантах осуществления, если уровень GIBsPLA2-индуцированной активации CD4 Т-клеток в присутствии агента выше уровня GIBsPLA2-индуцированной активации CD4 Т-клеток при отсутствии агента, то агент идентифицируют как потенциальный иммуносупрессивный терапевтический агент.

В некоторых вариантах осуществления измерение GIBsPLA2-индуцированной активации CD4 Т-клеток включает определение числа ММД на CD4 Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления измерение GIBsPLA2-индуцированной активации CD4 Т-клеток включает определение среднего диаметра ММД на CD4 Т-клетках.

В некоторых вариантах осуществления измерение GIBsPLA2-индуцированной активации CD4 Т-клеток включает определение способности CD4 Т-клеток к ответу на IL-7 при анализе STAT5 фосфорилирования и/или импорта в ядро.

Как применяется в настоящем изобретении, "агент" может быть любым химическим веществом, оцениваемым в качестве потенциального терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления агент является органической молекулой. В некоторых вариантах осуществления агент содержит от 2 до 100 углеродных атомов, такое количество как от 2 до 50 углеродных атомов, от 5 до 50 углеродных атомов или от 10 до 50 углеродных атомов. В некоторых вариантах осуществления агент является пептидом, белком, гликопротеином или липопротеином. В некоторых вариантах осуществления агент является антителом.

В некоторых вариантах осуществления для агента не было ранее определено, что он обладает биологической активностью, позволяющей применять его в качестве терапевтического агента для лечения иммунодефицита, такого как тот, который часто ассоциируется с ВИЧ-инфекцией. В некоторых вариантах осуществления для агента ранее было определено, что он обладает биологической активностью, позволяющей применять его в качестве терапевтического агента для лечения иммунодефицита, такого как тот, который часто ассоциируется с ВИЧ-инфекцией.

Как применяется в настоящем изобретении "потенциальный агент для лечения иммунодефицита" или "потенциальный агент для лечения ВИЧ" является агентом, подавляющим способность RIF к активации CD4 Т-клеток по меньшей мере в одном анализе. В соответствии с данными, приведенными в настоящем изобретении, способность агента к подавлению способности GIBsPLA2 к активации CD4 Т-клеток по меньшей мере в одном анализе является подходящим способом идентификации агентов, которые, вероятно, являются терапевтически пригодными для лечения иммунодефицитов, включая иммунодефициты, ассоциированные с ВИЧ-инфекцией. Соответственно это также является подходящим способом идентификации агентов, которые, вероятно, являются терапевтически пригодными для лечения ВИЧ-инфекции. Конечно, как и со всеми терапевтическими молекулами, необходима дополнительная характеристика. Однако это не снижает полезных свойств потенциальных агентов для лечения ВИЧ из настоящего изобретения.

Дополнительные аспекты и преимущества изобретения раскрыты в следующем разделе, посвященном экспериментам; их нужно рассматривать как иллюстративные.

### Примеры

#### 1. Материалы и методы.

##### 1.1. Пациенты.

VP, включенные в исследование, были ВИЧ-позитивными в течение более чем одного года. Они не получали каких-либо антиретровирусных лекарств и имели вирусную нагрузку > 10,000 РНК копий/мл с числом CD4>200/мкл ко времени сбора крови (исследования ANRS EP33 и EP20). Все образцы крови от VP собирали в Больничном центре Гонесса. Кровь от HD была предоставлена Французской службой

крови (Centre Necker-Cabanel, Париж). Образцы плазмы от ART пациентов брали у индивидуумов, получающих лечение в течение по меньшей мере одного года. Их вирусная нагрузка была невыявляемой в течение по меньшей мере 6 месяцев, а количество CD4 составило более 500/мкл ко времени сбора крови. Образцы плазмы от НИС пациентов брали у индивидуумов с невыявляемой вирусной нагрузкой в течение 10 лет после инфицирования. Образцы плазмы собирали в Инфекционном центре Necker-Pasteur.

1.2. Анализ мембранных микродоменов (ММД), скорости диффузии рецепторов и клеточной компартиментализации фосфо-STAT5 в очищенных CD4 Т-лимфоцитах.

CD4 Т-клетки очищали путем негативной селекции, как уже описано (10), затем активировали 2 нМ рекомбинантного гликозилированного человеческого IL-7 (Cytheris) или 40 мкг ФГА (Sigma). Конфокальная и STED микроскопия, использованная для изучения микродоменов клеточной поверхности (ММД) и распределения фосфо-STAT5 в клеточном компартменте, уже описаны (10, 12). FCS анализ диффузии белков на поверхности живых клеток также описан (10, 12).

1.3. Приготовление и анализ детергент-резистентных микродоменов (ДРМ) Приготовление с Тритоном-X100 лизатов CD4 Т-лимфоцитов от HD или VP, с последующим центрифугированием на градиентах сахарозы и вестерн-блот анализом собранных фракций уже описано (12). Моноклональные антитела, специфичные к флотиллину, IL-7R-альфа и гамма-с, использовали для детекции соответствующих полос при вестерн-блоттинге (12).

#### 1.4. Характеристика RIF из плазмы VP 1.4.1.

##### Биоанализы.

Индукцию ММД осуществляли следующим образом: VP плазму (5 или 10%) вначале инкубировали (20 мин) в среде с очищенными HD CD4 Т-клетками. Клетки затем помещали на покрытые полилизинном стеклянные слайды на 10 мин, затем активировали в течение 15 мин IL-7 (2 нМ) или не активировали для контроля (NS), затем фиксировали PFA (PFA, 1,5%, 15 мин при 37°C, затем 15 мин при комнатной температуре), уравнивали в течение 1 ч в PBS/SVF 5% перед окрашиванием холерным токсином В (CtxB-AF488). ММД подсчитывали посредством STED микроскопии.

Анализ ингибирования фосфорилирования STAT и транслокации в ядро проводили следующим образом: VP плазму (5 или 10%) вначале инкубировали с очищенными HD CD4 Т-клетками (20 мин) перед стимуляцией IL-7 (2 нМ, 15 мин). Затем клетки помещали на покрытые полилизинном стеклянные слайды на 10 мин, затем активировали в течение 15 мин IL-7 (2 нМ) или не активировали для контроля (NS), затем фиксировали PFA (PFA, 1,5%, 15 мин при 37°C, затем 15 мин при комнатной температуре) и проводили пермеабиллизацию метанолом (90% при -20°C). Клетки уравнивали в течение 1 ч в PBS/SVF 5%, затем окрашивали фосфо-STAT5 кроличьими антителами к STAT5, мечеными козьими антителами к кроличьим Atto642 и анализировали посредством FACS или STED микроскопии.

#### 1.4.2. Обработка ферментами.

Влияние ферментативного расщепления на активность RIF оценивали путем обработки VP плазмы, фильтрованной на мембране 30 кДа. Соединения плазмы с молекулярной массой меньше 10 кДа использовали в качестве отрицательного контроля. Анализировали эффекты свиного трипсина (1 Ед/мл в течение 30 мин при 37°C, с последующим PMSF ингибированием и обменом буфера на мембранных центрифужных фильтрах Millipore 5 кДа), или ДНКазы I (1 Ед/мл в течение 30 мин при 37°C) или РНКазы (1 Ед/мл в течение 30 мин при 37°C) или пептид N-гликаназы (1 Ед/мл в течение 30 мин при 37°C). Все препараты анализировали при конечной концентрации 10%.

#### 1.4.3. Определение молекулярной массы или очистка RIF.

Гельпроникающую хроматографию проводили путем загрузки 1,6 мл плазмы на 85 мл колонку с Сефадексом G-100, предварительно уравновешенную карбонатом аммония (0,1 М) или ФБР, затем собирали фракции элюата по 0,8 мл. Колонку калибровали с применением набора белков (GE-Healthcare). Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорда. VP плазму предварительно фильтровали на мембране 100 кДа, тестировали общую VP плазму и получали идентичные результаты. Собирали фракции 13-17 кДа, которые содержали полуочищенный RIF.

#### 1.4.4. Определение изоэлектрической точки.

Анионо- или катионообменную хроматографию проводили на 1 мл колонках MonoQ или MonoS (GE-Healthcare) с элюцией последовательными этапами со сменой pH (буферы карбоната аммония/ацетата аммония). Измеряли pH каждой элюированной фракции и затем доводили pH до 7,4 перед анализом биологических эффектов. Активность RIF измеряли в соответствующих фракциях немедленно после элюции.

#### 1.4.5. МС анализ.

Образцы от гель-фильтрации (G100) лиофилизировали, затем ресуспендировали, собирали и подвергали протеолизу свиным трипсином, в соответствии со способами, известными в данной области техники. Пептиды после протеолиза разделяли на 12 фракций посредством хроматографии на C18 колонке, элюируя ацетатом аммония. 12 фракций, разделенных на C18, элюировали в обращенной фазе (с ацетонитрилом) и напрямую вводили путем электрораспыления в Orbitrap Velos (Thermo Scientific) для МС анализа с вторичной Ag-фрагментацией, затем проводили МС/МС для 10 пиков с наиболее высокой ин-

тенсивностью на МС сканирование.

Использовали стандартные программы Mascot и X-Tandem. Для каждого белка из поднаборов базы данных, рассчитывали 3 критерия:

i-индекс: расчет теоретической специфичности каждого из пептидов после расщепления трипсином отдельного белка в базе данных NextProt, обогащенной зрелыми белками с расщеплением сигнальной последовательности (число уникальных пептидов/белок): число специфических пептидов для всех человеческих последовательностей (all), последовательности с N-концевым сигнальным пептидом (sec) на белок;

расчет теоретической частоты пептидов, совместимых с пиками из всех серий МС сканирования (пики, совпадающие с теоретическими пептидами/белок);

расчет теоретического охвата белковой последовательности с пептидами, совпадающими с пиками.

Для каждого белка определяли r-индекс по результатам из всех трех индексов.

Пример 1. Аберрантная активация CD4 Т-лимфоцитов от VP по результатам анализа наличия аномальных мембранных микродоменов (ММД).

Этот пример описывает исследование новых молекулярных и клеточных параметров, которые объясняют некоторые аномальные ответы, наблюдающиеся в CD4 Т-лимфоцитах от пациентов с хронической ВИЧ-инфекцией. Хроническую активацию иммунной системы обычно определяют путем оценки избыточной экспрессии молекул клеточной поверхности, таких как CD38, HLA-DR и CD25, которые считаются главными маркерами дисфункции CD4 (15). Однако, несмотря на многие попытки, эти данные остаются неясными и фенотип CD4 Т-клеток не позволяет непосредственно объяснить их иммунные дефекты.

STED микроскопию и маркировку холерным токсином В (CtxB-AF488) использовали для детекции наличия ММД (12). Было установлено, что перед какой-либо стимуляцией поверхность CD4 Т-лимфоцитов, выделенных от VP, несла гораздо больше ММД, чем у покоящихся CD4 Т-лимфоцитов, выделенных у HD (фиг. 1a). И наиболее важно, что все CD4 Т-клетки от VP показали повышенное число ММД. Этот аномальный характер не был следствием стимуляции IL-7 в VP плазме, поскольку средняя концентрация IL-7 в этой плазме (0,4 пМ) составила только 100 Kd от IL-7R (13, 14). Когда очищенные CD4 Т-клетки от HD стимулировали IL-7, наблюдалось большое количество ММД. Напротив, на характер ММД на CD4 Т-клетках от VP не оказывал влияния IL-7 (фиг. 1a). Эта аномальная активация вместе с отсутствием какого-либо ответа на IL-7 может быть имитирована нефизиологическим стимулом, таким как фитогемагглютинин (ФГА) (фиг. 1a).

Затем подсчитывали эти различные аномальные ММД. Наблюдалось около 150-200 ММД на CD4 Т-клетку от VP, как для ФГА-стимулированных HD CD4 Т-клеток (фиг. 1c). Вновь полученные результаты показали, что все CD4 Т-клетки от VP экспрессировали ММД, включая все основные субпопуляции CD4 (фиг. 1c). IL-7 не вызывал повышения числа ММД у VP. Напротив, число ММД на HD CD4 Т-клетках возрастало от фонового примерно 10 ММД/клетку до 300 после стимуляции IL-7. Также проводили изучение размера ММД (фиг. 1d и 1e). Это показывает, что ММД на CD4 Т-клетках от VP и на ФГА-стимулированных HD CD4-клетках были гораздо больше (250 нм), чем на HD CD4 Т-клетках, стимулированных IL-7 (90 нм).

Пример 2. Все IL-7R альфа и гамма-с цепи являются секвестрированными в аномальных детергент-резистентных мембранных микродоменах (ДРМ), выделенных из VP CD4 Т-клеток.

Покоящиеся HD CD4 Т-клетки анализировали, чтобы подтвердить, что IL-7R альфа и гамма-с цепи расположены во фракциях высокой плотности вне ММД. Когда эти HD CD4 Т-клетки стимулировали IL-7, эти две цепи располагались во фракциях низкой плотности, соответствующих детергент-резистентным ММД или ДРМ, содержащим все белки, секвестрированные в ММД (фиг. 2).

Когда исследование повторяли на CD4 Т-клетках, выделенных от VP, характер был другим (фиг. 2). Прежде какой-либо стимуляции все IL-7R альфа и гамма-с цепи были уже секвестрированы в ДРМ; ничего не располагалось во фракциях высокой плотности, соответствующих свободным рецепторам вне ММД. Далее предварительная стимуляция CD4 Т-клеток IL-7 перед получением ДРМ не влияет на этот характер (данные не показаны). Вновь предварительная стимуляция HD CD4 Т-клеток нефизиологическим ФГА воспроизводит это патологическое состояние. Это подтверждает данные на фиг. 1 и демонстрирует, что CD4 Т-клетки у VP являются предметом аберрантной активации до какой-либо стимуляции. Кроме того, эти аномальные ММД содержат все цепи IL-7R (фиг. 2).

Пример 3. Двухмерный анализ в геле IL-7 сигнасомы в очищенных CD4 Т-клетках из HP, VP и IL-7-стимулированных HD клеток. Характеристика аберрантного состояния активации посредством характера белка, полученного после иммунопреципитации.

Двумерный электрофорез использовали для демонстрации того, что состав IL-7 сигнасомы у VP был аномальным и отличался от того, что наблюдается в покоящихся и IL-7-активированных CD4 Т-клетках (фиг. 7a, b и c).

Белки подвергали иммунопреципитации с антителами к IL-7R-альфа (мышинными моноклональными антителами 40131, R&D System), иммобилизованными на протеин G-Сефарозе 4G из лизата очищенных CD4 Т-клеток, и разделяли посредством двумерного ПАГЭ (ИЭФ на полосках геля при pH 3-10 с последующим ДСН-электрофорезом в 12% акриламидном-бисакриламидном геле). Отображены значе-



ния pH и молекулярной массы (кДа). Гели окрашивали с Sypro-Ruby. Показанные гели являются примерами 8 NS/IL-7 пар, полученных от HD, и 3 геля от VP.

Фиг. 7а. Не стимулированные (NS) HD CD4 Т-клетки.

Фиг. 7b. VP CD4 Т-клетки. Больше пятен наблюдалось в двумерных гелях, окрашенных Sypro Ruby, с образцами от VP, чем от HD. Кроме того, мы наблюдали, что общие пятна были более интенсивными, когда 2D-гели были получены с VP экстрактами.

Фиг. 7с. IL-7-стимулированные HD CD4 Т-клетки. Характер в HD CD4 Т-клетках, стимулированных IL-7, отличается от того, что наблюдалось в VP CD4 Т-клетках. Это также поддерживает предположение о том, что aberrantная активация, наблюдаемая в VP, не является следствием стимуляции IL-7, которая может происходить в органах с высоким уровнем IL-7, например в IL-7-продуцирующих органах.

На основе этого анализа можно сделать вывод, что цепи IL-7R в VP CD4 Т-клетках не являются частью аномальных ММД, но также что они взаимодействуют с белковыми комплексами, отличающимися от тех, которые находятся в нормальной IL-7 сигналомоме.

Пример 4. Скорость диффузии IL-7R-альфа на поверхности очищенных CD4 Т-клеток из HP, VP и ФГА-стимулированных HD клеток. IL-7R-альфа в VP CD4 Т-клетках встроен в богатые липидами аномальные ММД, таким образом, ограничивая их скорости диффузии и предотвращая любые взаимодействия с цитоскелетом и, таким образом, какую-либо способность к передаче сигналов.

Двухмерную диффузию IL-7R-альфа с окрашиванием моноклональными антителами AF488-анти-IL-7R-альфа измеряли посредством FCS на поверхности живых CD4 Т-клеток. Результаты показаны на фиг. 8. Время диффузии  $\tau D$  (в  $10^{-3}$  с) измеряли при отсутствии IL-7 (○ автокорреляция) или в присутствии IL-7-биотин-SAF633 (● взаимная корреляция), как описано (10, 12). Эти значения времени строили против площади клеточной поверхности  $\omega_0^2$  (в  $10^3$  нм<sup>2</sup>), прерываемой конфокальным объемом.

Показаны кривые диффузии с предварительной обработкой ингибиторами ММД (ХОаза 1 мкг/мл плюс СМаза 0,1 мкг/мл в течение 30 мин), или ингибиторами цитоскелета (ЦитD 10 мкМ плюс Кол 10 мкМ в течение 30 мин), или без нее.

Столбцы указывают СКО от 5 независимых экспериментов. Тангенсы угла наклона линейной регрессии дают эффективные скорости диффузии  $D_{\text{eff}}$ , а у-интерсепты экстраполируют время удержания  $\tau_0$ , как мы описывали раньше (12).  $D_{\text{eff}}$  показаны на гистограмме на фиг. 3а.

Фиг. 8а, 8d - на поверхности HD CD4 Т-клеток.

Фиг. 8b, 8e - на поверхности VP CD4 Т-клеток.

Фиг. 8с, 8f - на поверхности HD CD4 Т-клеток, предварительно активированных ФГА (1 мкг/мл).

Фиг. 8g. Схема механизма диффузии IL-7R-альфа, встроенного в ММД, до и после обработки ингибиторами ММД или ингибиторами цитоскелета. ММД указаны дисками, рецепторы - палочками, цитоскелет показан в виде сети. Скорости диффузии (быстрая, медленная, очень медленная) указаны для упрощения интерпретации данных. Эта схема иллюстрирует результаты, также указанные на фиг. 3а.

Пример 5. Цепи IL-7R, секвестрированные в аномальных ММД VP CD4 Т-клетках, являются не функциональными.

Скорости диффузии IL-7R измеряли на поверхности CD4 Т-клеток, как описано раньше (10, 12), и как подробно изложено в примере 4. Было видно, что перед какой-либо стимуляцией эти скорости диффузии были в три раза ниже на VP, чем на HD CD4 Т-клетках (фиг. 3а). Это дополнительно демонстрирует, что цепи IL-7R-альфа встроены в аномальные ММД на поверхности этих CD4 Т-клеток (фиг. 3а). Обработка ХОазой плюс СМазой высвобождает рецептор из ограничивающих его ММД и, таким образом, повышает его скорость диффузии (фиг. 3а). Напротив, обработка цитохалазином D (CytD) плюс колхицином (Col), которые дезорганизуют цитоскелет, не оказывает влияния на скорость диффузии цепи IL-7R на VP CD4 Т-клеток (фиг. 3а). Поскольку организация цитоскелета абсолютна необходима для передачи сигнала, это отсутствие какой-либо функциональной или структурной связи между IL-7R-альфа и цитоскелетной сетью позволяет предположить, что передача сигнала не может происходить, когда комплексы IL-7R секвестрированы в аномальных ММД, как в случае VP CD4 Т-клеток.

Затем использовали импульсную STED микроскопию для изучения фосфорилирования STAT5 (фосфо-STAT5) и разделения фосфо-STAT5 в цитоплазме и ядре HD и VP CD4 Т-клеток. Фиг. 3b показывает STED изображения распределения фосфо-STAT5 до и спустя 15 мин после стимуляции IL-7. Мы отметили, что фосфо-STAT5 аккумулировались в ядре HD CD4 Т-клеток, и этот феномен ингибировался дезорганизацией цитоскелета. Напротив, не отмечалось транслокации фосфо-STAT5 в ядро в VP CD4 Т-клетках или в предварительно стимулированных ФГА HD CD4 Т-клетках (фиг. 3b).

Затем изучали кинетику появления фосфо-STAT5 в цитоплазме и ядре в течение 1 ч (фиг. 3с, d, e). Это показывает, что фосфо-STAT5 в VP CD4 Т-клетках накапливается главным образом в цитоплазме и не мигрирует в ядро (фиг. 3d), как в ФГА-стимулированных HD CD4 Т-клетках (фиг. 3e). Это особенно понятно, когда результаты сравнивали с теми, которые были получены спустя 5 мин после стимуляции IL-7 HD CD4 Т-клеток, где 50% фосфо-STAT5 находилось в ядре (фиг. 3с).

Пример 6. Плазма от VP индуцирует аномальные ММД на поверхности очищенных HD CD4 T-клеток.

Затем изучали источник aberrантной активации VP CD4 T-клеток. Тот факт, что все CD4 T-клетки были вовлечены и что нефизиологический сигнал, такой как ФГА, имитировал результаты, привел к исследованию плазмы VP. Очищенные HD CD4 T-клетки инкубировали с 10% плазмой VP в течение 30 мин и подсчитывали ММД на поверхности CD4 T-клеток, как определялось по маркировке холерным токсином В (CtxB-AF488). На фиг. 4 показаны полученные изображения. Плазма VP по отдельности индуцировала большое число ММД на HD CD4 T-клетках. Добавление IL-7 не влияло на размер или число этих ММД (фиг. 4a). Эти результаты показаны для плазмы от пяти разных VP (фиг. 4b) и были подтверждены с применением большего числа образцов плазмы от VP (>15). Эксперименты также повторяли с применением CD4 T-клеток от различных HD (>5). В качестве контроля использовали образцы плазмы от индивидумов с контролируемой ВИЧ-инфекцией (HIC) и пациентов, получающих антиретровирусную терапию (ART), на очищенных HD CD4 T-клетках. Ни один из них не индуцировал ММД и не ингибировал IL-7-индукцию ММД (фиг. 4c).

Это дополнительно подтверждали путем тестирования большого числа разведений различных образцов плазмы (фиг. 4d). VP плазма до разведения 0,1% вызывала образование ММД, рассеянных по клеточной поверхности. VP плазма, разбавленная в 50-100 раз, обладала 50% от максимальной активности. Ни один из образцов плазмы от HIC или ART пациентов не индуцировал ММД в каком-либо разведении.

Пример 7. Плазма от VP ингибирует IL-7-индуцированную транслокацию фосфо-STAT5 в ядро.

Функцию IL-7R в HD CD4 T-клетках, обработанных VP плазмой, тестировали после фосфорилирования и транслокации в ядро STAT5. Как видно на фиг. 5a, предварительная инкубация HD CD4 T-клеток с VP плазмой (10% концентрация) ингибировала IL-7-индуцированное фосфорилирование и транслокацию в ядро STAT5. На фиг. 5b показаны результаты, полученные для пяти образцов плазмы VP. Все они при разведении 10% ингибировали транслокацию фосфо-STAT5 в ядро. Эти результаты были подтверждены с плазмой от различных VP (>15) и с различными источниками HD CD4 T-клеток (>5).

Эффект плазмы, полученной от HIC и ART пациентов, также тестировали путем предварительной инкубации с очищенными HD CD4 T-клетками (фиг. 5a и c). Вновь только VP плазма была способна ингибировать IL-7-индуцированную транслокацию фосфо-STAT5 в ядро. Также было определено (фиг. 5d), что VP плазма была активна до разведения 0,1%, и полумаксимальная активность была получена при 50-100-кратном разведении, таким образом, коррелируя со способностью к индукции аномальных ММД (фиг. 4d).

Также тестировали эффект плазмы, полученной от пациентов, получающих антиретровирусную терапию, но не отвечающих (CD4-NR) на лечение (низкое количество вирусной РНК и низкое количество CD4 T-клеток), путем ее предварительной инкубации с очищенными HD CD4 T-клетками. Вновь только CD4-NR плазма была способна к ингибированию IL-7-индуцированной транслокации фосфо-STAT5 в ядро. Также было определено, что CD4-NR плазма была активна до разведения 0,1%, и полумаксимальная активность была получена при 50-100-кратном разведении, что коррелировало со способностью к индукции аномальных ММД, как наблюдалось с VP.

Пример 8. Молекулярная характеристика фактора, индуцирующего резистентное состояние.

Исследовали химическую природу RTF. Проведенные исследования показали (фиг. 6a), что RTF является белком, поскольку его активность разрушалась трипсином. Обработка пептид-N-гликаназой (ПНГазой) не оказывала влияния, что указывало, что для RTF активности не требовалось N-гликозилирования.

Затем определяли молекулярную массу RIF посредством гелепроникающей хроматографии на Сефадексе G-100. Измеряли индукцию ММД (фиг. 6b) и ингибирование IL-7-индуцированной транслокации фосфо-STAT5 в ядро (фиг. 6c) для всех фракций, элюированных с колонки. Два образцовых профиля элюции приведены на фиг. 6. Оба показывают, что RTF является единственным фактором с молекулярной массой от 10 до 15 кДа.

На фиг. 6d показаны плотности вирусных пептидов или белков, измеренные посредством методики дот-блот в каждой из 100 фракций, собранных с колонки с Сефадексом G100. Измерения повторяли три раза с различными поликлональными антителами из образцов VP плазмы, характеризующимися высокой активностью в отношении вирусных белков. Для каждого эксперимента сигналы, полученные с образцами плазмы HD, вычитали из этих значений. Картина, показанная на фиг. 6b, демонстрирует, что не выявляется вирусных белков или фрагментов во фракции, содержащей RIF активность, в то время как дот-блот анализ показал наличие вирусных белков при более высокой молекулярной массе (от 190 до 32 кДа).

Активные, обогащенные фракции 10-15 кДа с колонки с Сефадексом G100 использовали для получения изоэлектрической точки RIF путем сорбции на анионо-(MonoQ) или катионообменных (MonoS) колонках с последующей элюцией в градиенте pH (повышение pH на MonoS или снижение pH на MonoQ) (фиг. 6d). ММД-индуцирующую активность различных pH фракций затем измеряли после доведения pH до 7,4. В целом от 25 до 30% от исходной активности выделялось в двух фракциях, результаты соответствовали изоэлектрической точке 6,5-8,0.

Таким образом, RIF является секретруемым белком с молекулярной массой около 15 кДа, и pI

около 7,5-8,0, содержащим дисульфидный мостик. Следуя вышеуказанным структурным и функциональным характеристикам, была непосредственно установлена идентичность RIF. В частности, из всех 36853 известных человеческих белков только 62 имеют четыре вышеуказанные характеристики RIF. Полученный материал, полученный от трех пациентов с вирусемией и трех FID, анализировали посредством масс-спектрометрии с применением стандартной программы Mascot. Полученные белки располагали в соответствии с р-шкалой, описанной в "Материалах и методах". Результаты, показанные в табл. 1, прямо указывают, что RIF является GIBsPLA2.

Таблица 1

Мнемокод	ID	pI	М.м.	i_s_p_шкала	Описание
PA21B_HUMAN	P04054	7,95	14138,99	9 0,64	Фосфолипаза A2 группа 1
TMEM9_HUMAN	Q9P0T7	6,23	18568,37	5 0,29	Трансмембранный белок 9 (TM)
ESM1_HUMAN	Q9NQ30	6,83	18122,42	5 0,10	Специфическая молекула эндотелиальных клеток 1
CYTD_HUMAN	P28325	6,76	13858,6	3 0,08	Цистатин-D
SSRB_HUMAN	P43308	7,03	18273,74	7 0,05	Рецептор сигнальной последовательности, субъединица бета (TM)
GPIX_HUMAN	P14770	6,14	17316,06	6 0,04	Тромбоцитарный гликопротеин IX
B2MG_HUMAN	P61769	7,67	18510,47	4 0,03	Бета-2-микроглобулин
EPGN_HUMAN	Q6UW09	7,72	14724,99	1 0,02	Эпиген
IL19_HUMAN	Q9UHD0	7,8	17812,56	5 0,02	Интерлейкин-19
IL3_HUMAN	P08700	7,05	15091,38	3 0,02	Интерлейкин-3
GML_HUMAN	Q99445	6,67	15918,41	7 0,02	ГФИ-заякоренный белок
CYTM_HUMAN	P05113	7,02	13149,22	4 0,017	Цистатин-M

Таким образом, белок, найденный в плазме пациентов с вирусемией, является секретируемой формой GIBsPLA2. Зрелый белок содержит 125 аминокислот (М.м. 14138), имеет pI 7,95 и 7 дисульфидных мостиков. С применением коммерческой свиной GIBsPLA2 мы смогли подтвердить *in vitro*, что этот белок индуцирует аномальные ММД, которые блокируют транслокацию IL-7 pSTAT5 в ядро в плазме пациентов с вирусемией, дополнительно подтверждая, что RIF является GIBsPLA2, в частности ее секретируемой формой. Аминокислотная последовательность человеческой GIBsPLA2 приведена как SEQ ID NO: 2.

Пример 9. PLA2sGIB индуцирует неспособность к ответу (анергию) CD4 Т-лимфоцитов.

Пример 7 показывает, что PLA2sGIB, посредством индукции ММД, индуцирует блокаду IL-7-индуцированной транслокации фосфо-STAT5 в ядро (NT pSTAT5). В результате CD4 Т-лимфоциты не отвечают на IL-7, и несмотря на высокий уровень этого цитокина в плазме ВИЧ-инфицированных пациентов, их число снижается, приводя к CD4 лимфопении, являющейся ключевой характеристикой ВИЧ-инфицированных пациентов.

Таким образом, мы исследовали возможность того, что PLA2sGIB также участвует в индукции анергии, другой характеристики CD4 лимфоцитов от ВИЧ-инфекцией.

Биоанализ.

Индукция ММД.

VP плазму, содержащую PLA2sGIB, вначале инкубировали (20 мин) в среде с очищенными HD CD4 Т-клетками. Клетки затем помещали на покрытые полилизинном стеклянные слайды еще на 10 мин. Затем их фиксировали параформальдегидом (PFA, 1,5%, 15 мин при 37°C, затем 15 мин при комнатной температуре) перед окрашиванием холерным токсином В (CtxB-AF488); ММД подсчитывали посредством CW-STED микроскопии (микроскопии на основе подавления спонтанного испускания с непрерывной генерацией импульсов).

Ингибирование STAT фосфорилирования и транслокации в ядро.

VP плазму, содержащую PLA2sGIB, вначале инкубировали с очищенными HD CD4 Т-клетками (20 мин) перед стимуляцией IL-7 (2 нМ, 15 мин). Затем клетки помещали на покрытые полилизинном стеклянные слайды перед фиксацией PFA (1,5%) и пермеабиллизацией метанолом (90%, при -20°C). Затем pSTAT5 окрашивали с помощью кроличьих антител к STAT5, меченных козьими антителами к кроличьим иммуноглобулинам Atto642, и анализировали посредством FACS (флуоресцентной сортировки клеток) или импульсной STED микроскопии.

Результаты.

На фиг. 10а показано, что после воздействия PLA2GIB (плазмы от пациентов с вирусемией) CD4 лимфоциты от здоровых доноров (HD) становятся неспособными к ответу на IL-2, как определялось по ингибированию IL-2-индуцированной NT pSTAT5. Это ингибирование было полным с 3% плазмой и было существенно выраженным с 1% плазмой ( $p < 0,0001$ ).

Затем мы изучали ответ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на PLA2GIB. Результаты представлены на фиг. 10b. Как показано, в то время как 100% здоровых клеток отвечало на IL-2 посредством NT pSTAT5, PLA2 GIB (1% плазма пациентов с вирусемией) полностью ингибировала этот механизм трансдукции сигнала. Поскольку CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клетки представляют менее 5% от всех CD4 Т-клеток, они не могут существ-

венно влиять на данные, представленные на фиг. 10а.

IL-7 и IL-2 являются членами  $\gamma$ -с семейства цитокинов. Чтобы подтвердить, что неспособность к ответу на данный может быть связана с  $\gamma$ -с, мы тестировали их ответ на IL-4. Ответ на IL-4 мы измеряли по индуцированной IL-4 транслокации в ядро pSTAT6 (фиг. 11). Наши результаты ясно показали, что ответ на IL-4 ингибируется PLA2 GIB (полностью с 3% плазмой и в значительной степени с 1% плазмой).

Таким образом, эти результаты показали, что механизмы передачи сигнала, индуцированные цитокинами семейства  $\gamma$ с, изменяются посредством PLA2 GIB. Это полностью согласуется с нашими наблюдениями о том, что гамма-цепь рецептора полностью секвестрирована в аММД, спонтанно находящихся на поверхности CD4 лимфоцитов от ВИЧ-пациентов (данные не показаны).

Пример 10. Активность рекомбинантных форм PLA2 GIB.

В этом примере тестировали активность различных очищенных форм PLA2 GIB белков для дополнительного подтверждения влияния этого белка в очищенной форме на иммунную систему и для дополнительного подтверждения его специфичности.

Ферментативный анализ.

Анализ проводили на наборе для анализа Enz Check PLA2 от Life Technologies (ref.: E102147). Этот анализ обеспечивает непрерывный быстрый мониторинг активности ферментов PLA2 в режиме реального времени. PLA2 активность определяли по повышению интенсивности при одной длине волны 515 нм. PLA2 выявляли по изменениям отношения интенсивности испускания при 515/517 нм при возбуждении при 460 нм. Удельную активность выражали в виде количества флуоресцентного субстрата (Ед.) в секунду и на мкг фермента в растворе.

Результаты.

Результаты приведены в табл. 2 ниже.

Таблица 2. Активность рекомбинантных PLA2 GIB белков

PLA2	Происхождение	Исходная концентрация (мг/мл)	Итоговая концентрация (мкг/мл)	Количество (мкг)	Удельная активность (Ед./мкг/сек)
ppPLA2 IB	Очищена из свиной поджелудочной железы	2,90	0,58	0,06	7694,31
pPLA2 IB	Рекомбинантная свиная (в E. coli)	1,40	2,80	0,14	10353,57
hPLA2 IB	Рекомбинантная человеческая (в E.coli)	0,70	1,40	0,07	10694,57
hPLA2 IIA	Рекомбинантная человеческая (в E.coli)	1,45	2,90	0,15	214,93
hPLA2 IID	Рекомбинантная человеческая (в E.coli)	0,70	1,40	0,07	445,21
hPLA2 X	Рекомбинантная человеческая (в E.coli)	0,68	1,36	0,07	3318,97

Результаты показали, что рекомбинантная человеческая PLA2 GIB, полученная в E. coli, обладает мощной ферментативной активностью. Далее результаты также показали, что рекомбинантная свиная PLA2GIB, полученная в E. coli, обладает удельной активностью, подобной активности рекомбинантной человеческой PLA2GIB. Напротив, рекомбинантные PLA2GIIA и PLA2GIID не являются активными, а PLA2GX имеет очень ограниченную активность.

Таким образом, рекомбинантная PLA2 GIB является мощным активным агентом для применения в настоящем изобретении.

Пример 11. Влияние PLA2 GIB на CD4 лимфоциты включает ее ферментативную активность.

В этом примере мы исследовали, действительно ли влияние PLA2 GIB на CD4 лимфоциты включает (например, является последствием) ферментативную (например, каталитическую) активность PLA2 GIB. Такая ферментативная активность может модифицировать мембранную структуру, приводя к образованию множественных аММД на поверхности CD4 лимфоцитов.

В этих экспериментах мы тестировали мутант PLA2 GIB, где критический гистидин в положении 48 был замещен глутамином (мутант H48Q). С применением ферментативного анализа, описанного в примере 10, мы сравнили ферментативную активность рекомбинантной свиной PLA2 GIB, полученной в E. coli, с активностью мутантной H48Q, также полученной в E. coli. Каждый белок использовали в количестве 200 мкМ. Как показано на фиг. 12, мутант полностью утратил ферментативную активность, что указывает на критическую роль гистидина в положении 48 в PLA2 GIB. Затем мы сравнивали активность немутантной свиной PLA2 GIB с активностью мутанта H48Q в биоанализе. Результаты, представленные на фиг. 13, показывают, что мутант утратил способность немутантной PLA2 GIB к индукции аММД, или к снижению, или отмене IL-7-индуцированной транслокации pSTAT5 в ядро (NT pSTAT5).

Эти результаты, таким образом, демонстрируют, что ферментативная активность вовлечена в патогенетические эффекты PLA2 GIB в отношении CD4 лимфоцитов.

Пример 12. Антитела к PL2 GIB восстанавливают активность CD4 T-клеток в плазме пациентов с ВИЧ вирусемией.

Этот пример показывает, что в плазме пациентов с вирусемией GIBsPLA2 трансформирует CD4 лимфоциты от HD в "больные" лимфоциты, сопоставимые с теми, которые характерны для крови ВИЧ-инфицированных пациентов. Кроме того, этот пример показывает, что антитела к GIBsPLA2 эффективно подавляют патогенную активность.

В первой серии экспериментов плазму обрабатывали сефарозными гранулами, покрытыми либо козьими антителами, направленными против человеческой GIBsPLA2, либо двумя контрольными козьими антителами, направленными против не соответствующих антигенов. На фиг. 14a ясно видно, что антитела к GIBsPLA2 полностью отменяют или удаляют активность плазмы, которая становится неспособными к индукции аномальных ММД в CD4 лимфоцитах от HD. Контрольные антитела I и II не оказывают влияния. Эти эксперименты повторяли три раза для каждой плазмы, и изучали три различных образца плазмы от пациентов с вирусемией.

Фиг. 14b демонстрирует идентичные результаты. Здесь плазму обрабатывали, как указано выше, но анализировали с применением второго биоанализа. Плазма, обработанная сефарозными гранулами, покрытыми анти-GIBsPLA2 антителами, больше не ингибировала IL-7-индуцированную транслокацию pSTAT5 в ядро. Контрольные козы антитела I и II не влияли на способность плазмы от больных с вирусемией к ингибированию IL-7-индуцированной транслокации pSTAT5 в ядро.

Во второй серии экспериментов мы тестировали эффекты нейтрализующих кроличьих антител, специально направленных против человеческих GIBsPLA2, -GIIA и -GIID. Эти антитела инкубировали с плазмой и клетками во время биоанализов. Полученные результаты показали, что анти-GIBsPLA2 антитела нейтрализуют эффекты вирусемической плазмы, как определено по индукции аномальных ММД и по ингибированию IL-7-индуцированной транслокации pSTAT5 в ядро. Следует отметить, что антитела, направленные против секретируемой PLA2-GIIA или секретируемой PLA2-GIID, двух фосфолипаз, тесно связанных с GIBsPLA2, не оказывали влияния в этом анализе.

Эти результаты показывают, что анти-GIBsPLA2 антитела могут обращать и предотвращать иммуносупрессивный эффект вирусемической плазмы. Эти результаты показывают, что анти-GIBsPLA2 антитела могут предотвращать иммунодефицит и повторно стимулировать иммунный ответ у иммунодефицитных субъектов.

Кроме того, эти результаты демонстрируют, что ответ является специфическим. GIBsPLA2 является единственным эффектором, вовлеченным в исследуемый патогенный эффект и характеризующим плазму пациентов с вирусемией.

Пример 13. Анти-PLA2GIB антитела ингибируют влияние PLA2 GIB на CD4 клетки.

Клонированную и очищенную человеческую PLA2GIB использовали для иммунизации кроликов. Готовили иммуноглобулиновые фракции из соответствующих сывороток. Их способность к ингибированию ферментативной активности PLA2GIB измеряли на радиоактивно меченых мембранах *E. coli*. Активные иммуноглобулиновые фракции добавляли в биоанализ, включающий CD4 лимфоциты, очищенные из крови здоровых доноров. Затем клонированные и очищенные секретируемые PLA2 (GIB, GIIA, GIID и GX) добавляли в культуры. В качестве контроля использовали иммуноглобулиновые фракции, приготовленные от кроликов, иммунизированных различными секретируемыми PLA2.

Фиг. 15 показывает, что различные концентрации поликлонального антитела ингибируют индукцию аММД (фиг. 15a) и блокируют IL-7-индуцированную NT pSTAT5 (фиг. 15b). Эта активность может быть получена с 1 мкг/мл до 100 мкг/мл Ig, содержащего анти-PLA2 GIB антитела. Эта активность является полностью специфической, поскольку антитела, направленные против PLA2 GIIA, PLA2GIID или PLA2GX, не показали эффекта в биоанализе (фиг. 15a и b).

Таким образом, эти результаты дополнительно демонстрируют, что ингибирование PLA2GIB можно использовать для лечения иммунодефицитов и для восстановления CD4 активности.

Пример 14. Растворимый рецептор PLA2GIB ингибирует эффекты PLA2 GIB в отношении CD4 T-клеток.

В качестве дополнительной демонстрации того, что ингибиторы PLA2GIB могут проявлять терапевтический эффект, мы тестировали растворимую форму рецептора PLA2GIB.

В первых сериях эксперимента мы использовали растворимый мышинный рецептор, специфичный к PLA2 GIB, имеющий следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 22):

MVQWLAMLQLLWLQQLLLGIHQGIAQDLTHIQEPSLEWRDKGIFIIQSES�KTCI

QAGK

SVLTLENCKQPNEHMLWKWVSDHFLFNVGGSGCLGLNISALEQPLKLYECDSTL  
 ISLRWHCDRKMIEGPLQYKVVQKSDNTVVARQIHRWIAYTSSGGDICEHPSRDLYTLK  
 GNAHGMPCVFPFQFKGHWHHDCIREGQKEHLLWCATTSRYEEDKWFPCPDPTSMKV  
 FCDATWQRNGSSRICYQFNLLSSLSWNQAHSSCLMQGGALLSIADEDEEDFIRKHLKSV  
 VKEVWIGLNQLDEKAGWQWSDGTPLSYLNWSQEITPGPFVEHHCGTLEVVSAAWRSR  
 DCESTLPYICKRDLNHTAQGILEKDSWKYHATHCDPDWTFNRKCYLKKDRKSWLG  
 ALHSCQSNDSVLMDVASLAEVEFLVSLLRDENASETWIGLSSNKIPVSFEWSSGSSVIFT  
 NWYPLEPRILPNRRQLCVSAEESDGRWVKDKCKERLFYICKKAGQVPADEQSGCPAGW  
 ERHGRFCYKIDTVLRSFEEASSGYCSPALLTITSRFEQAFITSLISSVAEKDSYFWIALQD  
 QNNTGEYTWKTVGQREPQYTYWNTRQPSNRGGCVVVRGGSSLGRWEVKDCSDFKA  
 MSLCKTPVKIWEKTELEERWPFHPCYMDWESATGLASCFKVFHSEKVLKRSWREAE  
 AFCEEFGAHLASFAHIEEENFVNELLHSKFNWTQERQFWIGFNRRNPLNAGSWAWSGDG  
 SPVVSSFLDNAYFEEDAKNCAVYKANKTLLPSNCASKHEWICRIPRDVRPKFPDWYQY  
 DAPWLFYQNAEYLFHTHPAEWATFEFVCGWLRSDFLTIYSAQEQEFIHKIKGLTKYGV  
 KWWIGLEEGGARDQIQWSNGSPVIFQNWDKGREERVDSQRKRCVFISITGLWGTEENS  
 VPLPSICKRVKIWVIEKEKPPTQPGTCKGWL YFNKYCFLVTIPKDPRELKTWTGAQEF  
 VAKGGTLVSIKSELEQAFITMNLFGQTTNVWIGLQSTNHEKWVNGKPLVYSNWSPSDII  
 NIPSYNTTEFQKHIPLCALMSSNPNFHFTGKWFYDDCGKEGYGFVCEKMQDTLEHHVN  
 VSDTSAIPSTLEYGNRTYKIIRGNMTWYAAGKSCRMHRAELASIPDAFHQAFLTVLLSRL  
 GHTHWIGLSTTDNGQTFDWSGDGTSKSPFTYWKDEESAFLGDCAFADTNGRWHSTACESF  
 LQGAICHVVTETKAFEHPGLCSETSPWIKFKGNCYSFSTVLDSRSFEDAHEFCKSEGSN  
 LLAIRDAEAENSFLLEELLAFGSSVQMVWLNQAFDNNKTLRWFDTPTQSNWGLRKP  
 DMDHLKPHPCVVLRIPEGIWHFTPCEDKKGFKMEAGIPAVTAQPEKGLSHSIVPVTVT  
 LTLIALGIFMLCFWIYKQKSDIFQRLTGSRGSYYPTLNFSTAHLEENILISDLEKNTNDEE  
 VRDAPATESKRGHKGRPICISP

Ингибитор тестировали в биоанализе, описанном в примере 9, при концентрации 100 нМ. Результаты представлены на фиг. 16. Они показывают, что рекомбинантный растворимый рецептор PLA2 можно использовать в качестве мощного антагониста и что такая молекула также способна существенно блокировать отрицательный эффект PLA2sGIB в отношении NT pSTAT5 (фиг. 16).

Подобные результаты можно получить в дополнительных сериях экспериментов с применением PLA2-GIB-связывающих полипептидов, включающих последовательность SEQ ID NO: 25 или 28.

Пример 15. Избыточная экспрессия GIBsPLA2 индуцирует иммунодефицит.

Ранее было показано, что высокоактивная антиретровирусная терапия (БААРТ), снижающая вирусную нагрузку, также индуцирует повышение числа CD4 у большинства пациентов. Однако у некоторых пациентов, несмотря на тот факт, что ВИЧ становится невыявляемым, число CD4 не увеличивается. Мы ранее изучали эту клиническую ситуацию и показали, что у этих пациентов, обозначаемых как пациенты без ответа CD4 (CD4-NR), отмечаются сильные и устойчивые дефекты популяции CD4 Т-лимфоцитов.

Фиг. 17 показывает, что плазма CD4-NR пациентов содержит больше активности PLA2 GIB, чем плазма пациентов с вирусемией, взятая в качестве контроля. Это вначале определяли по индукции аномальных ММД на клетках. Эти данные также были подтверждены путем измерения способности к ингибированию IL-7-индуцированной транслокации pSTAT5 в ядро.

Взятые вместе, эти результаты показывают, что плазма CD4-NR пациентов содержит в сотни раз больше активности PLA2 GIB, чем плазма от пациентов с вирусемией.

#### Обсуждение

Наши результаты показывают, что PLA2 GIB индуцирует иммуносупрессию, подобную той, кото-

рая характеризует CD4 Т-клетки от пациентов с вирусемией, включая неспособность к ответу на IL-2 (анергию) и IL-7 (центральный механизм, приводящий к CD4 лимфопении). Таким образом, экспрессия GIBsPLA2 при ВИЧ-инфекции играет центральную роль в патофизиологии иммунного заболевания, которое характеризует этих пациентов. Эти дефекты специфичны для типа клеток, поскольку CD8 Т-лимфоциты от ВИЧ-пациентов не проявляют аномальных ММД и продолжают отвечать на IL-7 (данные не показаны). Этот вид действия PLA2 GIB, вероятно, является последствием ее ферментативной активности. При поражении мембраны CD4 лимфоцита, она модифицирует текучесть мембраны и, вероятно, обеспечивает формирование аномальных и очень крупных ММД.

Воспалительные реакции играют важную роль при ВИЧ-инфекции. Однако их точная роль в патогенезе ВИЧ еще не установлена. С учетом наших данных можно предположить, что ВИЧ-инфекция индуцирует очень своеобразный тип воспаления, который включает GIBsPLA2. Далее можно предположить, что после индукции PLA2 GIB ее секреция избегает нормальных регуляторных процессов, таким образом, приводя к хронической продукции и к иммунным нарушениям, которые являются прямым последствием дисфункции CD4 Т-лимфоцитов. В качестве побочных последствий дисфункции CD4 Т-лимфоцитов могут также наблюдаться другие дефекты. Например, снижение продукции интерферона-гамма приводит к снижению функций моноцитов/макрофагов и естественных киллеров.

Корреляция между выходом активности PLA2 GIB в плазме и характеристиками различных групп пациентов также является очень информативной. "Контролирующие ВИЧ" являются очень редкими пациентами, которые сохраняют невыявляемую вирусную нагрузку и почти нормальное число CD4 в течение многих лет. Наши результаты показали, что они не экспрессируют активность PLA2 GIB в плазме. Напротив, у большинства пациентов этот фермент экспрессируется и представляет отрицательную сторону воспаления, что приводит к иммунному заболеванию. Все вместе это ясно показывает, что PLA2 GIB является критическим параметром в патофизиологии ВИЧ-инфекции.

Снижение вирусной нагрузки при ВААРТ сопровождается восстановлением иммунитета, включая повышение числа CD4. Во время этого лечения активность PLA2 GIB в плазме пациентов исчезает. Таким образом, считается, что ВААРТ снижает воспалительные реакции, что дополнительно позволяет предположить, что PLA2 GIB является частью этих воспалительных процессов. Более важно, мы описали случай CD4-NR пациентов, у которых остается очень низкое количество CD4, в то время как ВААРТ контролирует их вирусную нагрузку. Избыточная продукция PLA2 GIB, выявленная у этих индивидуумов, может объяснять стойкость иммунного нарушения, которое характеризует их клинический статус. Таким образом, после ВААРТ отмечается выраженная корреляция между снижением продукции PLA2 GIB, приводящей к восстановлению иммунитета, или стойкой избыточной продукцией, приводящей к необратимости иммунного заболевания.

Терапевтическое значение и полезность этого изобретения являются огромными. Ингибирование PLA2 GIB действительно можно применять для предотвращения или лечения иммунного заболевания ВИЧ-инфицированных больных, а также, в более широком смысле, страдающих иммунодефицитом индивидуумов. При раннем применении при инфекции ингибиторы PLA2 GIB приводят к достижению контролируемого статуса ВИЧ у пациентов. При более позднем применении, по отдельности или в сочетании/чередовании с ВААРТ они ускоряют восстановление функций CD4 Т-лимфоцитов, и путем усиления защиты хозяина, ингибиторы PLA2 GIB приводят к равновесию между вирусом и иммунной системой, как при многих других хронических вирусных инфекциях. Таким образом, ингибиторы PLA2 GIB представляют очень мощные агенты для применения, по отдельности или в комбинации, для лечения нарушений, связанных с аномальным иммунным ответом или активностью. Они могут также способствовать экономии ВААРТ и могут также позволять прерывать эту терапию, которая, как известно, связана с тяжелыми побочными эффектами.

Далее, поскольку отсутствие экспрессии GIBsPLA2 (как у мышей с соответствующим нокаутным геном) хорошо переносится, временная или постоянная супрессия GIBsPLA2 с применением ингибиторов или посредством вакцинации представляет мощную и надежную иммунотерапию иммунных заболеваний, в частности больных ВИЧ.

## Список цитируемой литературы.

- (1) Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RMM, Paul WE (2002) CD4<sup>+</sup> 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 KA, et al. (2012) HIV status, burden of comorbid disease and biomarkers of inflammation, altered coagulation, and monocyte activation. *Clin Infect Dis* 55(1)126-36.
- (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 JH, 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 AM, Patey A, Angel JB (2011) IL-7 dependent STAT-5 activation and CD8<sup>+</sup> 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):1341-7.
- (10) Rose T, et al. (2010) Interleukine-7 compartmentilizes 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-



5.

(14) Rose T, Lambotte O, Pallier C, Delfraissy JF, Colle JH (2009) Identification and biochemical characterization of human plasma soluble IL-7R: lower concentrations in HIV-1 infected patients. *J Immunol* 182(12):7389-97.

(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 SA, et al. (2003) HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin-2 producing HIV-specific memory CD4<sup>+</sup> T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* 198:1909-1922.

(17) Sirskyj 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):173-80.

(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 NG, Douek DC (2012) Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat Rev Microbiol* 10(9):655-66.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение ингибитора секретируемой фосфолипазы A2 группы IB (GIBsPLA2) для лечения заболевания, связанного с иммунодефицитом CD4 Т-клеток, у субъекта, нуждающегося в этом, где ингибитор GIBsPLA2 выбран из группы, состоящей из анти-GIBsPLA2 антитела, молекулы ингибирующей нуклеиновой кислоты, основанной на последовательности гена GIBsPLA2, растворимого рецептора GIBsPLA2 и пептида, содержащего от 3 до 20 аминокислотных остатков, где указанный пептид получают способом, включающим (i) приведение в контакт тестируемого пептида с GIBsPLA2, (ii) выбор тестируемого пептида, который связывает GIBsPLA2, и (iii) выбор того пептида из (ii), который ингибирует активность GIBsPLA2.

2. Применение по п. 1, где GIBsPLA2 является белком, содержащим аминокислотные остатки 23-148 последовательности SEQ ID NO: 2 или ее природного варианта.

3. Применение по п. 1 или 2, где антитело к GIBsPLA2 выбрано из анти-GIBsPLA2 поликлонального антитела, анти-GIBsPLA2 моноклонального антитела или GIBsPLA2-связывающих фрагментов, выбранных из F(ab')<sub>2</sub> фрагментов, Fab фрагментов, одноцепочечных переменных фрагментов (scFvs), однодоменных антител (VHH или нанотел), двухвалентных фрагментов антител (диател).

4. Применение по п. 3, где антитело к GIBsPLA2 является человеческим или гуманизированным.

5. Применение по п. 1, где ингибирующая нуклеиновая кислота, основанная на последовательности гена GIBsPLA2, выбрана из антисмысловой нуклеиновой кислоты, малой интерферирующей РНК, малой шпилечной РНК, микроРНК, аптамеров или рибозимов, которые ингибируют ген GIBsPLA2 или экспрессию белка GIBsPLA2.

6. Применение по любому из пп. 1-4 для индукции активации CD4 Т-клеток у субъекта.

7. Применение по любому из пп. 1-6, где у субъекта отмечается иммунодефицит или иммунодепрессия, инфекционное заболевание, такое как вирусная инфекция, или субъект болен раком.

8. Применение по любому из предыдущих пунктов для лечения СПИД у ВИЧ-инфицированного субъекта.

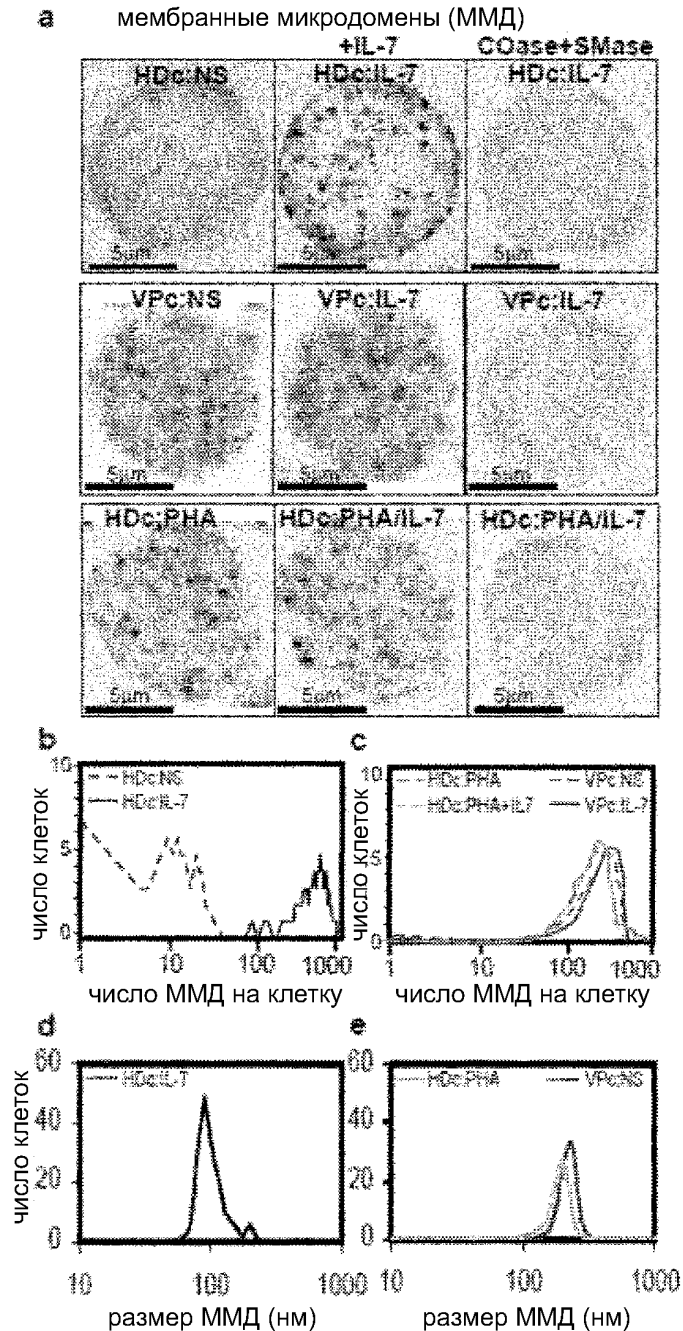
9. Применение по п. 8 для подавления или реверсирования ВИЧ-опосредованного иммунодефицита.

10. Применение по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор GIBsPLA2 вводится посредством инъекции, предпочтительно внутримышечной, подкожной, трансдермальной, внутривенной или внутриартериальной инъекции; или посредством назального, перорального, мукозального, ректального введения, или путем ингаляции.

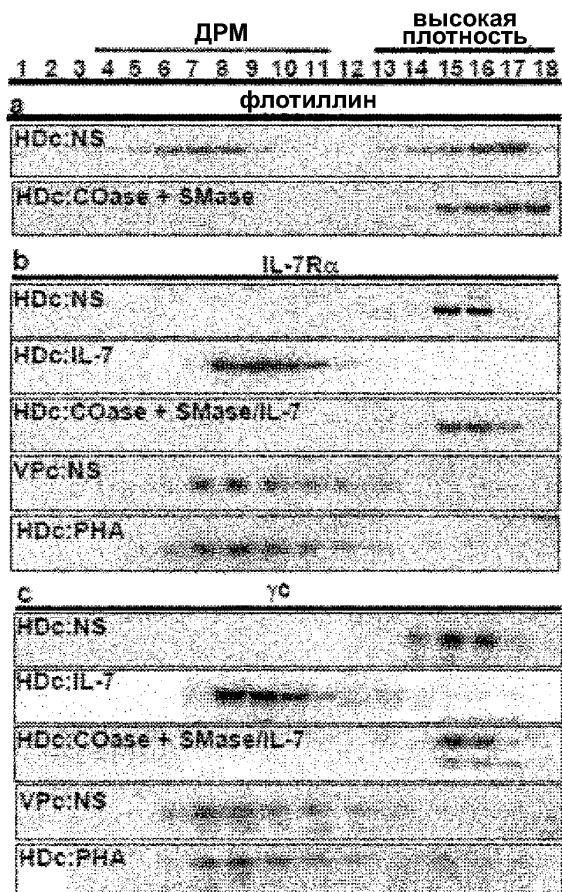
11. Фармацевтическая композиция в форме раствора для инъекций или суспензии для инъекций, включающая (i) ингибитор GIBsPLA2 и (ii) фармацевтически пригодный носитель или вспомогательное вещество, подходящие для раствора для инъекций или суспензии для инъекций, для лечения заболевания, связанного с иммунодефицитом CD4 Т-клеток, у субъекта, нуждающегося в этом, где ингибитор GIBsPLA2 является анти-GIBsPLA2 антителом, выбранным из анти-GIBsPLA2 поликлонального антите-

ла, анти-GIBsPLA2 моноклонального антитела, или их GIBsPLA2-связывающих фрагментов, выбранных из  $F(ab')_2$  фрагментов, Fab фрагментов, одноцепочечных переменных фрагментов (scFvs), однодоменных антител (VHH или нанотел), двухвалентных фрагментов антител (диател), и где GIBsPLA2 является белком, содержащим аминокислотные остатки 23-148 из SEQ ID NO: 2 или ее природного варианта.

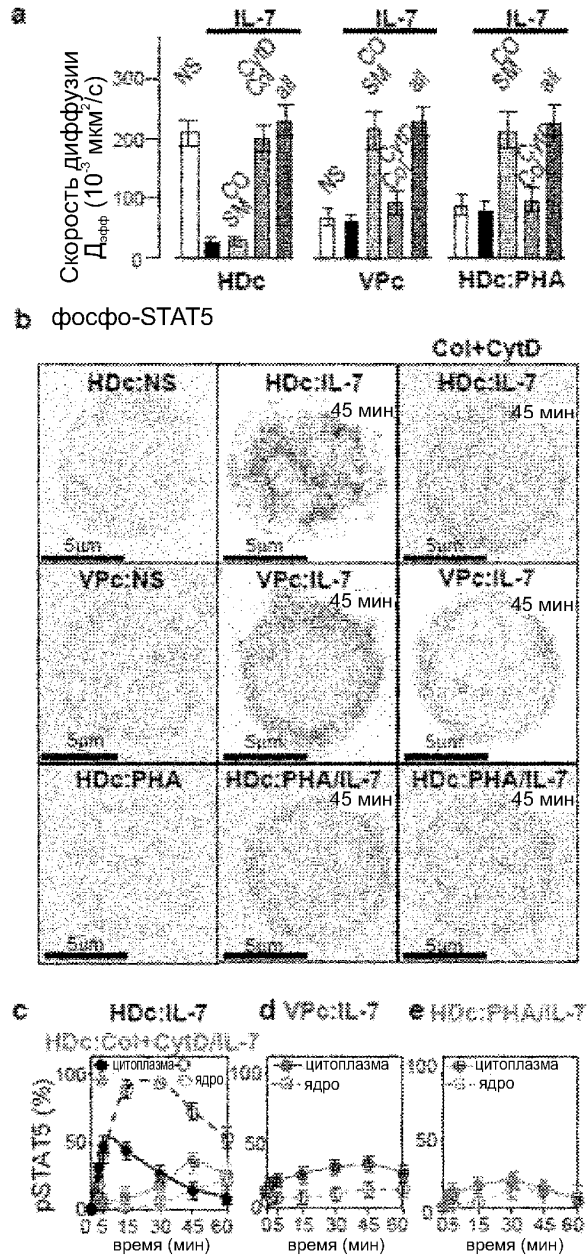
12. Способ лечения заболевания, связанного с иммунодефицитом CD4 Т-клеток, у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение указанному субъекту эффективного количества ингибитора GIBsPLA2, выбранного из группы, включающей анти-GIBsPLA2 антитело, ингибирующую нуклеиновую кислоту, основанную на последовательности гена GIBsPLA2, растворимого рецептора GIBsPLA2 и пептида, содержащего от 3 до 20 аминокислотных остатков, где указанный пептид получают способом, включающим (i) приведение в контакт тестируемого пептида с GIBsPLA2, (ii) выбор тестируемого пептида, который связывает GIBsPLA2, и (iii) выбор того пептида из (ii), который ингибирует активность GIBsPLA2.



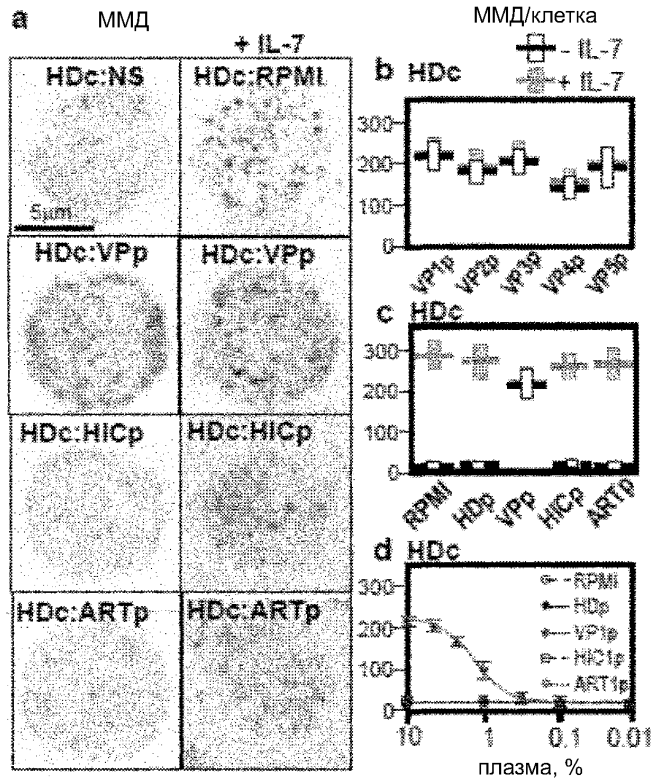
Фиг. 1



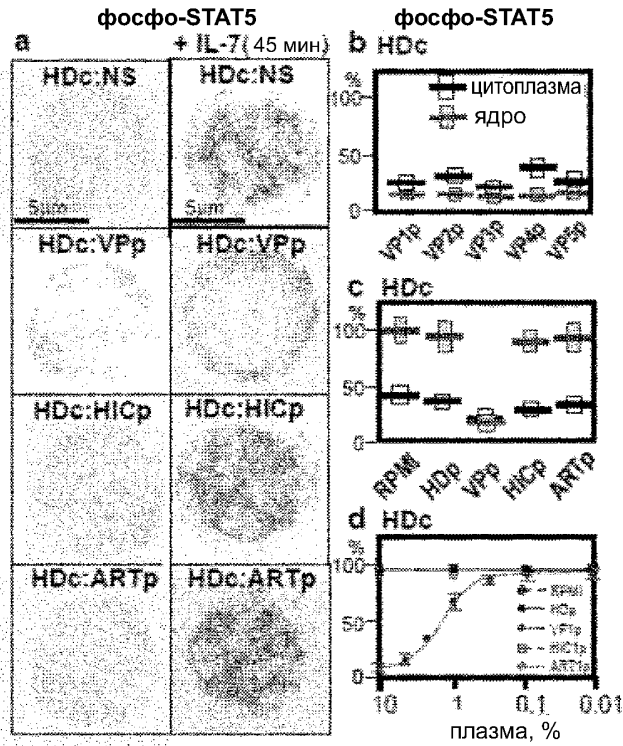
Фиг. 2



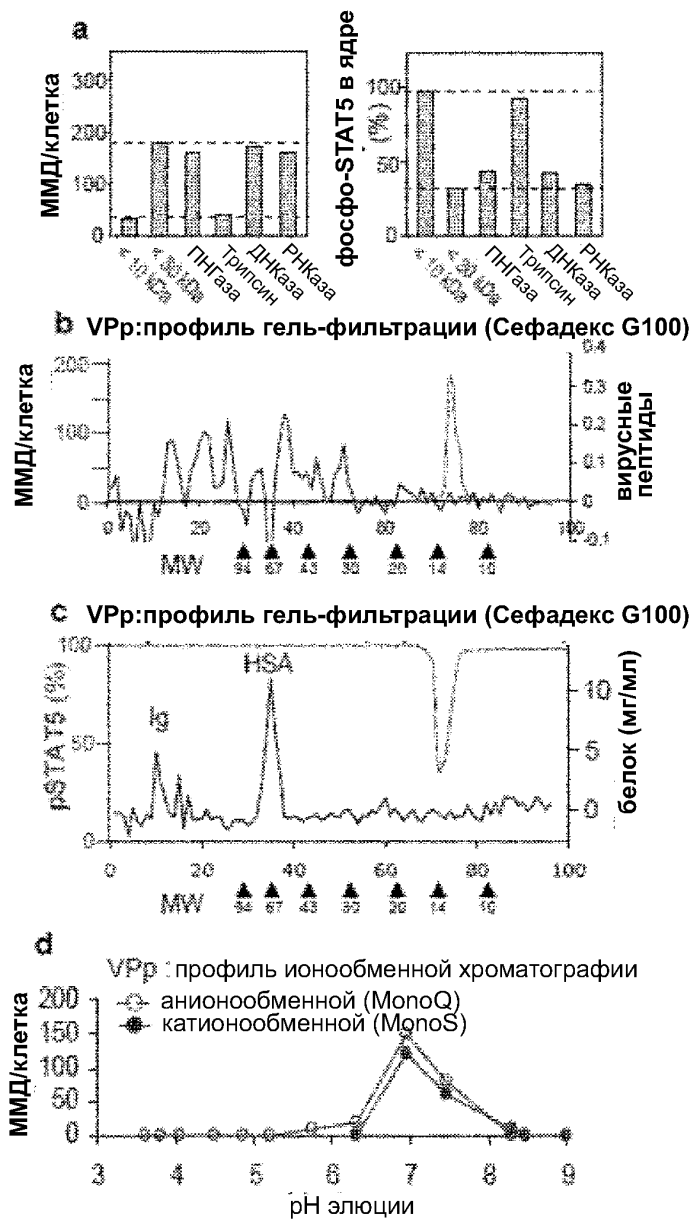
Фиг. 3



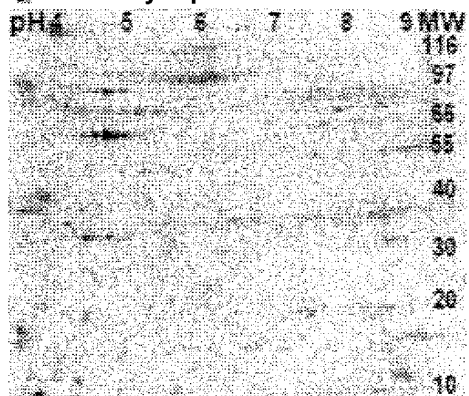
Фиг. 4



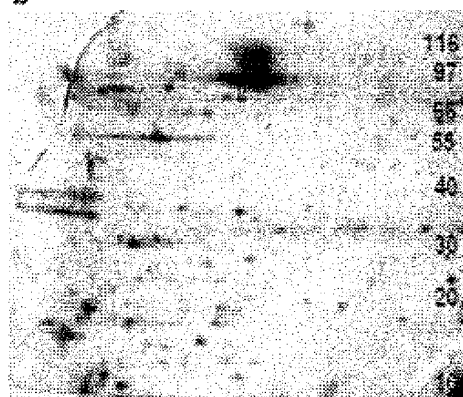
Фиг. 5



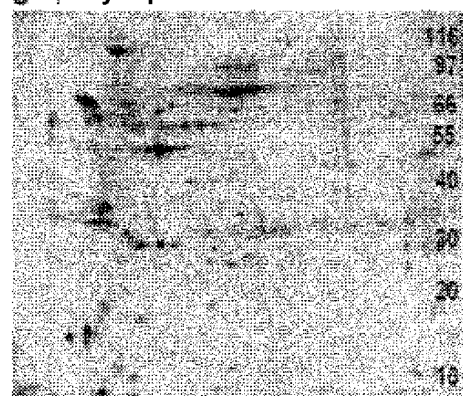
**а** не стимулированные HD CD4 T-клетки



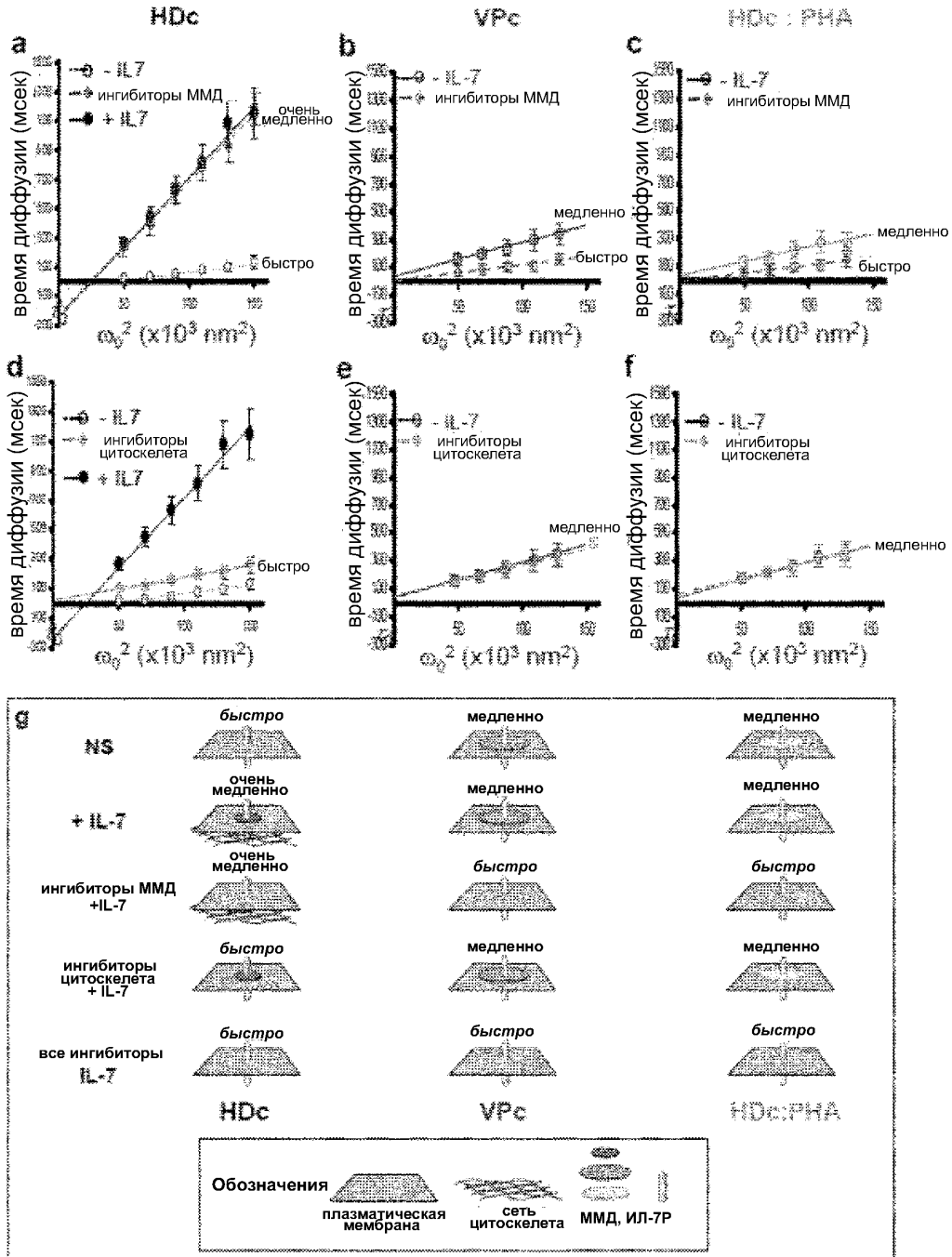
**б** VP CD4 T-клетки



**с** стимулированные ИЛ-7 HD CD4 T-клетки

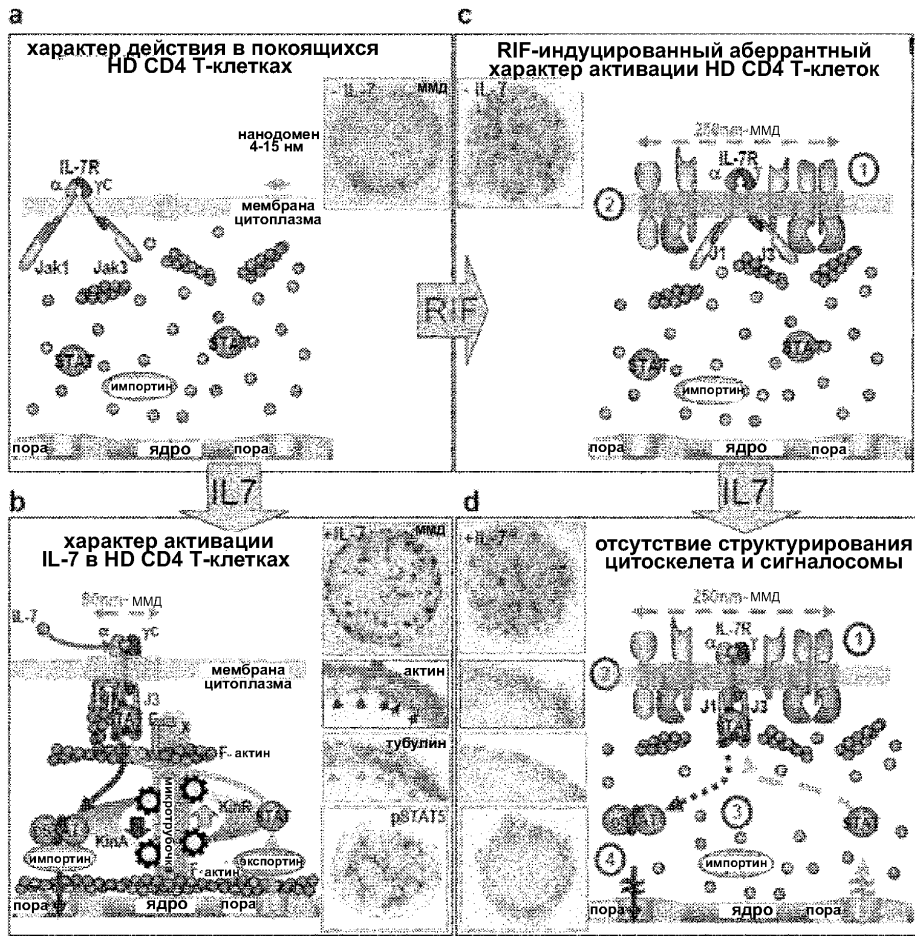


Фиг. 7



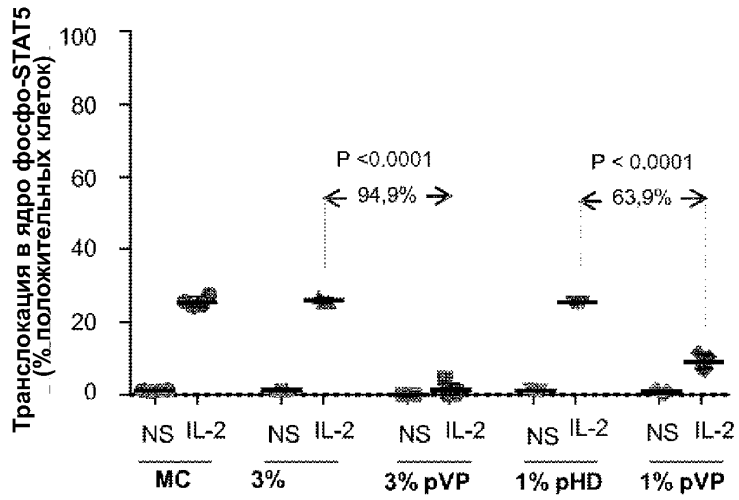
Фиг. 8



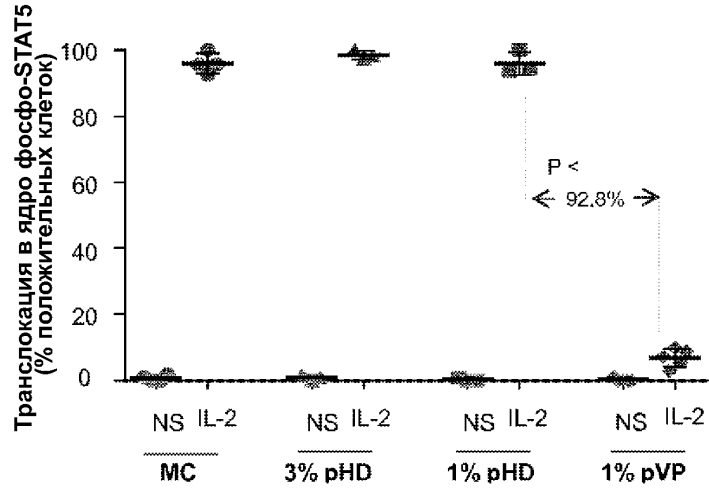


Фиг. 9

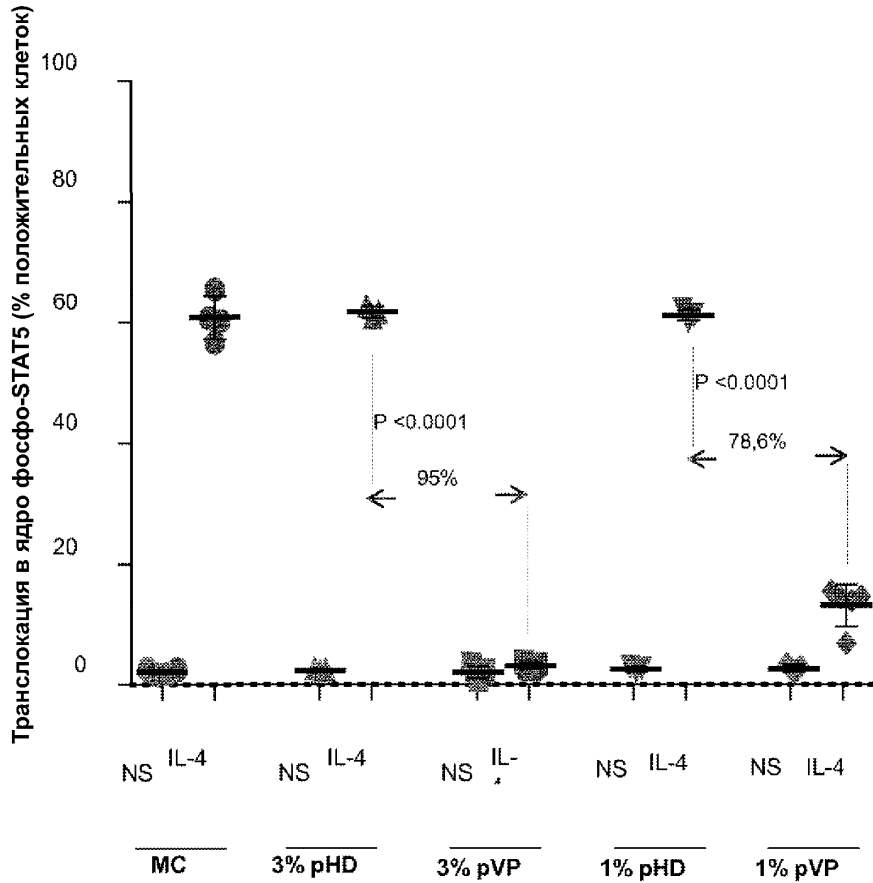
а. Все CD4 Т-клетки



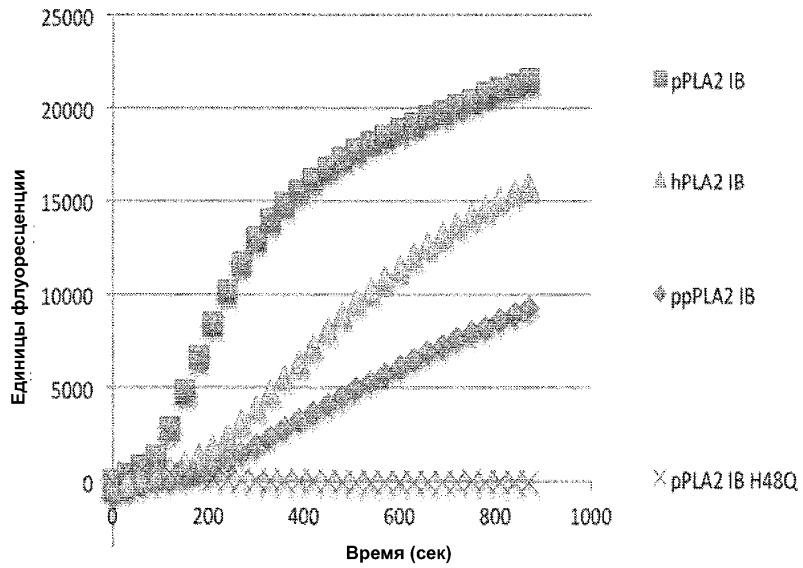
б. CD4+CD25+ Т-клетки



Фиг. 10

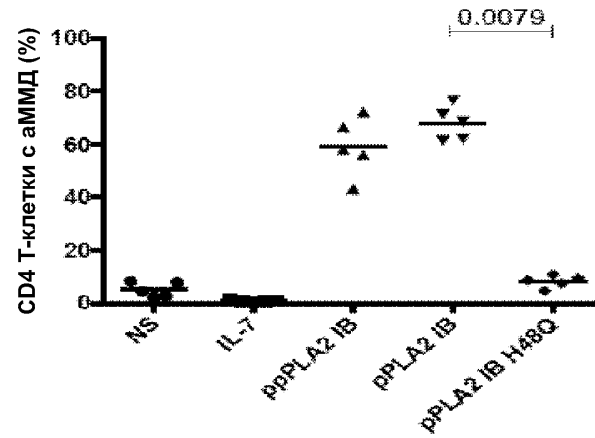


Фиг. 11

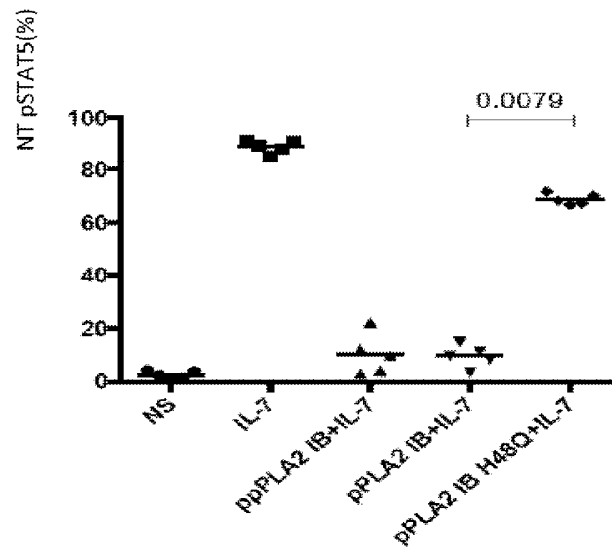


Фиг. 12

A

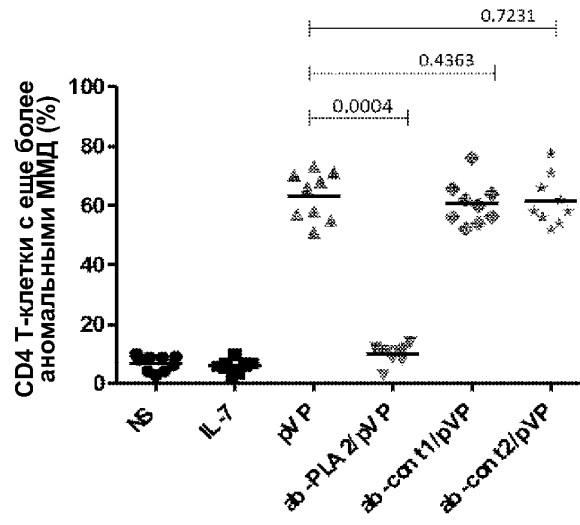


B

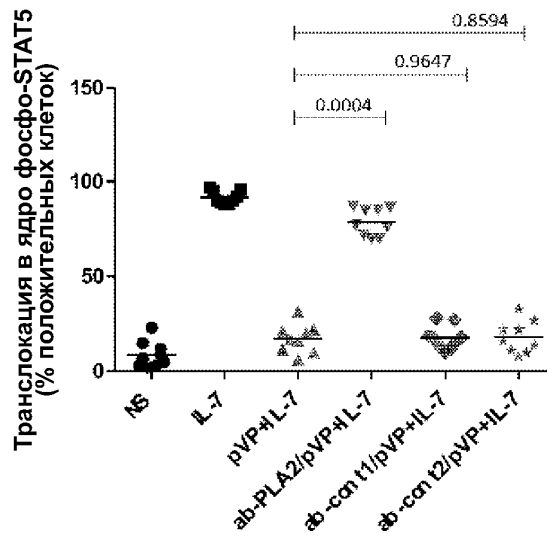


Фиг. 13

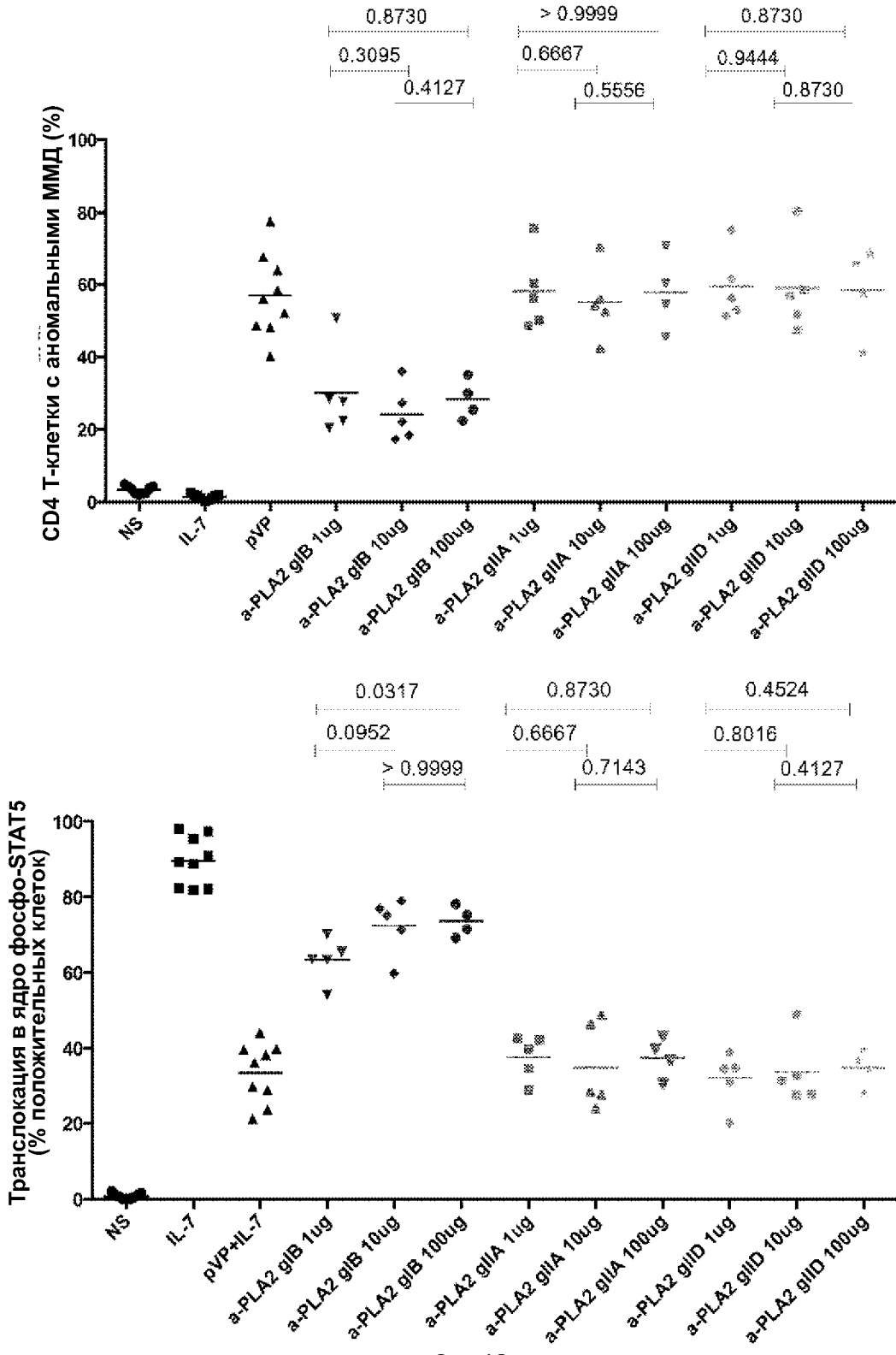
a.



b.

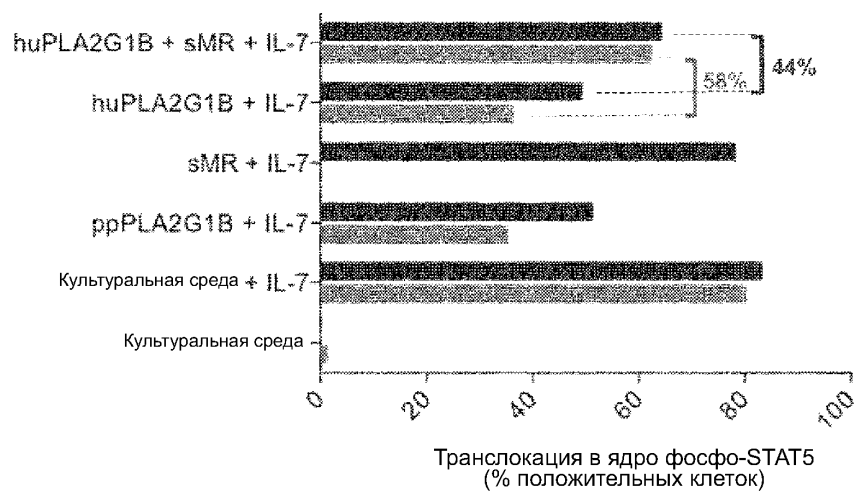


Фиг. 14



Фиг. 15

040303

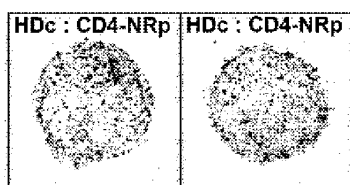


■ CD4 T-клетки от HD570

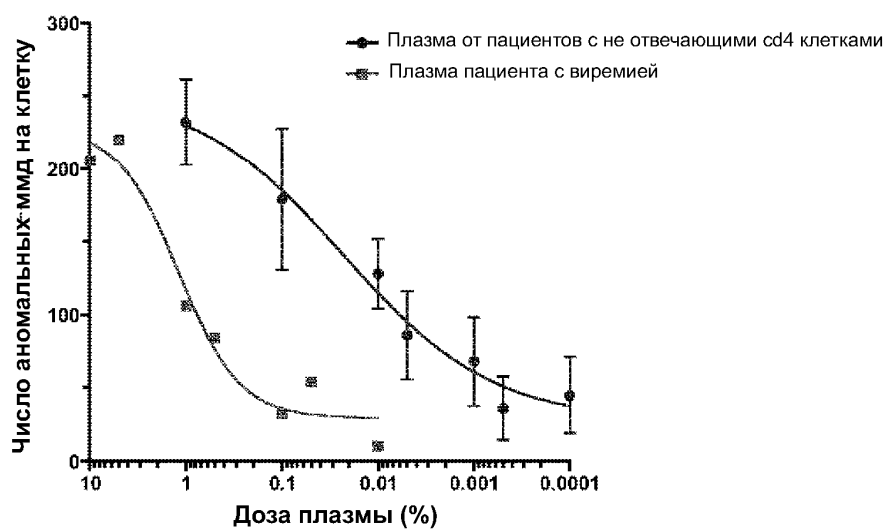
▨ CD4 T-клетки от HD403

Фиг. 16

a. ММД + IL-7



b.



Фиг. 17



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2