



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 316**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05716182 .0**
96 Fecha de presentación : **04.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1720572**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2006**

54 Título: **Ligando monovalente del receptor Fc α RI como un agente antiinflamatorio.**

30 Prioridad: **05.03.2004 EP 04290615**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.05.2011

73 Titular/es: **Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Monteiro, Renato;
Pasquier, Benoit;
Blank, Ulrich;
Benhamou, Marc;
Launay, Pierre y
Pretolani, Marina**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 359 316 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ligando monovalente del receptor FcαRI como un agente antiinflamatorio

La invención se refiere al uso de un ligando monovalente del receptor FcαRI de IgA como un agente antiinflamatorio.

5 La inmunoglobulina A (IgA) es el isotipo Ig más heterogéneo en los seres humanos, existiendo en múltiples formas moleculares, tales como IgA monomérica, polimérica o secretora; comprende dos subclases IgA1 e IgA2.

En suero, la IgA existe principalmente en forma monomérica, con un menor porcentaje de IgA polimérica (pIgA).

10 En las secreciones de las mucosas (saliva, lágrimas, calostro, fluidos gastrointestinales, secreción nasal bronquial y orina), la IgA se produce como dímeros, unida por un polipéptido denominado cadena J. La IgA dimérica se une al receptor Ig polimérico asociado con membranas (pIgR), y el complejo resultante se transporta desde el lado baso-lateral al apical/luminal del epitelio mucoso. Durante este transporte, el IgA unido se libera por escisión proteolítica a partir del pIgR; sin embargo, una porción del pIgR, el componente secretor, permanece asociado con la IgA dimérica, formando en conjunto IgA secretora (SIgA).

15 La SIgA tiene una función principal en el sistema inmune innato evitando la penetración de microorganismos y proteínas extrañas en las superficies mucosas. También neutraliza toxinas y organismos infecciosos.

20 Considerando que la función de la IgA secretora se establece en la inmunología de las mucosas, la función de los anticuerpos IgA séricos en su mayor parte desconocida. Aunque IgA es el segundo isotipo Ig más abundante en suero, normalmente no está implicado en las respuestas inmunes humores y no activa el complemento. La IgA sérica monomérica tiene actividad antiinflamatoria y es capaz de regular de forma decreciente funciones tales como fagocitosis inducida por IgG, actividad bacteriana, estallido oxidativo y liberación de citoquinas. Por el contrario, la IgA polimérica y los complejos inmunes que contienen IgA (IC) pueden desencadenar eficazmente funciones inmuno efectoras en los leucocitos de la sangre a través de los receptores Fc de IgA.

25 Los receptores para la región Fc de inmunoglobulinas (FcR) juegan un papel importante en la unión entre respuestas humores y celulares. Se han descrito FcR para las cinco clases de anticuerpos humanos.

30 La familia de receptores Fc de IgA humana (FcαR) comprende varios miembros (para una revisión, consúltese MONTEIRO y VAN DE WINKEL, Annu. Rev. Immunol. 21: 177-204, 2003), pero solo se ha identificado FcαRI (o CD89), un receptor específico para la región Fc de IgA, en las células mieloides de la sangre (MONTEIRO y col., J. Exp. Med. 171: 597-613, 1990; MALISZEWSKI y col., J. Exp. Med. 172: 1665-1672, 1990). Se expresa FcαRI en monocitos/macrófagos, células dendríticas, células de Kupffer, neutrófilos y eosinófilos y se unen tanto a IgA1 como a IgA2 (CONLEY y DELACROIX, Ann. Int. Med. 106: 892-899, 1987; KERR, Annu. Rev. Immunol. 12: 63-84, 1994) con baja afinidad ($K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$) (MONTEIRO y VAN DE WINKEL, 2003, mencionado anteriormente).

35 FcαRI es un miembro de la superfamilia de genes Ig. Comprende dos dominios extracelulares del tipo Ig (EC1 y EC2), una región transmembrana y una cola citoplasmática que carece de motivos de señalización reconocidos. Las estructuras cristalinas de FcαRI humana revelan que los dos dominios del tipo Ig se orientan en ángulos derechos entre sí y que son necesarias dos moléculas FcαRI para la unión de una molécula de IgA (HERR y col., J. Mol. Biol. 327: 645-657, 2003). El sitio de unión IgA se localiza en el dominio EC1 distal a la membrana. Se han generado anticuerpos monoclonales (mAb) anti-FcαRI de ratón y humanos (MONTEIRO y col., J. Immunol. 148: 1764-1770, 1992; SHEN y col., J. Immunol. 143, 4117-4122, 1989; documento PCT WO 91/05805; documento PCT WO 02/064634), y se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales que se unen en el dominio EC1 de FcαRI bloquean la unión IgA, mientras que los que se unen a EC2 no lo hacen.

40 Debido a la constante de asociación y disociación moderadamente rápida de la reacción que une FcαRI:IgA, la unión a la IgA monomérica es transitoria, mientras que los complejos inmunes de la IgA y la IgA polimérica se unen con una avidez de crecimiento respectivamente debido a un descenso en la constante de disociación (HERR y col., 2003, mencionado anteriormente; WINES, J. Immunol. 162: 2146-2153, 1999).

45 Se ha indicado la implicación de FcαRI en la capacidad de IgA para desencadenar respuestas inmunes, tales como fagocitosis, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), generación de superóxido, producto de citoquinas, presentación de antígenos y liberación de mediadores inflamatorios (para una revisión, véase MONTEIRO y VAN DE WINKEL, 2003, mencionado anteriormente). Se ha propuesto usar anticuerpos anti-FcαRI, tales como My 43 (documento PCT WO 91/05805), o los anticuerpos monoclonales humanos descritos en el documento PCT WO 02/064634, para activar estas respuestas inmunes mediadas por FcαRI.

También se ha propuesto usar anticuerpos anti-FcR, incluyendo anticuerpos anti-FcαRI, como vectores

para dirigir selectivamente los principios activos, tales como compuestos citotóxicos, a células que expresan receptores Fc (documento PCT WO 99/41285).

La patente de US 6018031 describe anticuerpos bifuncionales que contienen la región de unión de un anticuerpo anti-Fc α R y la región de unión de un anticuerpo dirigido contra una célula diana. Estos anticuerpos bifuncionales pueden unirse, por un lado, a dicha célula diana y, por otro lado, a células efectoras que expresan Fc α R. Su unión a Fc α R desencadena la actividad mediada por Fc α R de la célula efectora, dando como resultado la destrucción de la célula diana unida a la misma molécula de anticuerpo bifuncional.

La señalización a través de Fc α RI depende de la asociación de Fc α RI con la subunidad de cadena FcR γ , formando el trímero Fc α RI α /F γ . La cadena FcR γ contiene un motivo de activación basado en inmunorreceptores de tirosina (ITAM) en su cola citoplasmática (PFEFFERKORN y YEAMAN, J. Immunol. 153: 3228-3236, 1994; LAUNAY y col., J. Biol. Chem. 274: 7216-7225, 1999) que permite el reclutamiento de efectores de señalización cruciales (KINET, Annu. Rev. Immunol. 17: 931-972, 1999). Puede expresarse Fc α RI con o sin asociación física con la subunidad FcR γ . El Fc α RI sin γ internaliza y recicla IgA para la superficie celular, mientras que Fc α I asociado con FcR γ se dirige refiere al IgA complejado a lisosomas (LAUNAY y col., 1999, mencionado anteriormente; SHEN y col., Blood 97: 205-213, 2001). Hasta ahora no se ha identificado una función celular de Fc α RI sin agregado distinta de la del reciclaje de IgA. Se requieren agregaciones del receptor para la activación mediada por Fc α RI de las funciones celulares diana, tales como liberación de citoquina y presentación de antígenos (SHEN y col., 2001, mencionado anteriormente; PATRY y col., Immunol. 86: 1-5, 1995; GEISSMANN y col., J. Immunol. 166: 346-352, 2001).

Mientras que la implicación de Fc α RI en la inflamación mediada por IgA es bien reconocida, hasta ahora no se ha elucidado la base molecular que sustenta la capacidad antiinflamatoria de IgA. Aunque se ha indicado (WILTON, Clin. Exp. Immunol. 34, 423-8 1978; VAN EPPS y WILLIAMS, J Exp Med 144, 1227-42 1976) que las funciones inhibitoras de IgA requieren la región Fc α , la función de los receptores Fc de IgA aun se desconoce.

Un modelo de consenso de señalización negativa en el sistema inmune implica receptores con un motivo inhibidor basado en inmunorreceptores de tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático. Estos receptores inhibidores actúan por co-agregación con receptores activadores: La contaminación cruzada entre los dos receptores genera una señal negativa (RAVETCH y LANIER, Science, 290, 84-89, 2000). Un ejemplo de la clase ITIM de receptores inhibidores es el receptor Fc γ Fc γ RIIB. Sin embargo, no se conoce ningún receptor ITIM para la región Fc α .

Los inventores han descubierto que, inesperadamente, la ocupación monomérica de Fc α RI por un fragmento Fab monovalente de un anticuerpo dirigido contra el dominio EC2 de Fc α RI inhibió fuertemente la fagocitosis inducida por IgG y la exocitosis mediada por IgE, *in vitro*, y que, sorprendentemente, estos efectos se mediaron por el motivo ITAM de la subunidad FcR γ asociada con Fc α RI.

Además, los inventores han demostrado en un modelo de asma que la dirección *in vivo* de Fc α RI por dicho fragmento Fab monovalente se eliminó la hiper-reactividad bronquial inducida por antígenos y la inflamación de las vías respiratorias que la acompaña, particularmente infiltración de leucocitos en el tejido pulmonar. También han demostrado en un modelo de fibrosis renal intersticial y nefropatía obstructiva, que la dirección *in vivo* de Fc α RI por dicho fragmento Fab monovalente descendió considerablemente las reacciones inflamatorias patológicas.

Un objeto de la presente invención es el uso de un fragmento de anticuerpo monovalente dirigido frente al dominio EC2 del receptor Fc α RI, como principio activo antiinflamatorio en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria.

Las propiedades antiinflamatorias de dicho fragmento de anticuerpo monovalente se obtienen a partir de una regulación decreciente de las reacciones inflamatorias patológicas que implican células mieloides que expresan Fc α RI.

Los ejemplos de enfermedades inflamatorias que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen enfermedades alérgicas, en particular asma, así como enfermedades inflamatorias que implican interacciones entre inmunoglobulinas y FcR, tales como nefritis, artritis reumatoide y enfermedades autoinmunes (lupus, diabetes, etc.). También incluyen enfermedades inflamatorias no inmunes, tales como las inducidas por obstrucción unilateral uretral dando como resultado inflamación renal, toxicidad del riñón inducida por fármacos, trastornos inflamatorios intestinales, tales como enfermedad de Crohn.

Un fragmento de anticuerpo monovalente es un fragmento de inmunoglobulina que solo tiene un sitio de unión a antígeno, en contraste con una molécula de inmunoglobulina completa, que comprende al menos dos sitios de unión a antígeno. Son ejemplos de fragmentos monovalentes los fragmentos Fab que consisten en la cadena ligera y la primera mitad de la cadena pesada, o fragmentos scFv que consisten en las porciones variables de las cadenas pesada y ligeras de un anticuerpo, conectados a otra a través de un enlazador flexible (CLACKSON y col., Nature, 352, 624-628, 1991), formando de este modo una proteína de cadena individual.

Son bien conocidos procedimientos que permiten obtener fragmentos de anticuerpos monovalentes que pueden usarse en la práctica de la invención.

A modo de ejemplo, pueden obtenerse fragmentos Fab, mediante las técnicas convencionales de digestión enzimática, a partir de un anticuerpo dirigido contra el dominio EC2 del receptor FcαRI. Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal murino obtenido mediante la tecnología de hibridoma convencional. Ventajosamente, también puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano. Los anticuerpos quiméricos pueden obtenerse a partir de dichos anticuerpos monoclonales reemplazando los dominios de región constante por dominios humanos; los anticuerpos humanizados pueden obtenerse incorporando los CDR de dichos anticuerpos monoclonales en las regiones flanqueantes (FR) de un anticuerpo humano, usando técnicas, conocidas por los mismos, de injerto de CDR. Los anticuerpos monoclonales completamente humanos pueden obtenerse de la misma manera que los anticuerpos monoclonales murinos convencionales, con la excepción de que los ratones inmunizados son ratones transgénicos con un repertorio de inmunoglobulina humana, como se describe, por ejemplo, en el documento PCT WO 02/064634.

Pueden obtenerse directamente fragmentos de anticuerpos monovalentes, en particular fragmentos scFv, expresando, en una célula huésped apropiada, un ADN recombinante que comprende las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de un anticuerpo monoclonal, humanizado o humano contra el dominio EC2 del receptor FcαRI, asociado con un enlazador apropiado. También pueden generarse a partir de una biblioteca de expresión de anticuerpos en fagos, modulado por pan con el dominio EC2 del receptor FcαRI. También pueden obtenerse fragmentos scFv humanizados mediante el método descrito por ARNDT y col., (Int J Cancer 107, 822-829, 2003).

La especificidad hacia el dominio EC2 del receptor FcαRI de los anticuerpos y fragmentos monovalentes anteriores puede comprobarse ensayando su efecto sobre la unión de IgA al receptor FcαRI; los anticuerpos o fragmentos que no bloquean dicha unión son en la mayor parte de los casos dirigidos contra el dominio EC2. Sin embargo, se han indicado algunos anticuerpos no bloqueantes, tales como el anticuerpo A3 monoclonal, para reconocer un epítope entre los dominios EC1 y EC2 (MORTON y col., J Exp Med, 189, 1715-22, 1999). Por consiguiente, los ensayos anteriores se completarán o se reemplazarán ventajosamente por un ensayo de la unión de dichos anticuerpos o fragmentos monovalentes a una proteína recombinante que comprende el dominio EC2 y carecen del dominio EC1 del receptor FcαRI, tales como el receptor quimérico compuesto de EC2 FcαRI y EC1 Fcγ2R bovino descrito en MORTON y col. (1999, citado anteriormente). Como alternativa, los fragmentos monovalentes de anticuerpos anti-FcαRI que no bloquean la unión de IgA al receptor FcαRI pueden ensayarse directamente *in vitro* para obtener sus propiedades antiinflamatorias, por ejemplo su capacidad para inhibir la fagocitosis mediada por IgG en monocitos de sangre humana, o para inhibir la respuesta a degranulación mediada por IgE de una línea celular de mastocito que expresa FcαRI, como se describe en los ejemplos a continuación.

Para la práctica de la invención, los fragmentos de anticuerpos monovalentes pueden administrarse por vía sistémica o local, de diversas maneras.

A modo de ejemplo, pueden administrarse por vía parenteral, incluyendo, por ejemplo inyecciones intramusculares, intradérmicas, intravenosas, intraperitoneales, subcutáneas o locales.

También puede usarse la administración local en el tracto respiratorio, con la condición de que los fragmentos de anticuerpos monovalentes de la invención estén en una forma adecuada para su administración a las superficies de mucosas de las vías respiratorias. Por ejemplo, pueden estar suspendidas en una formulación líquida para su administración a un paciente en forma de aerosol o por medio de un dispositivo nebulizador similar a los que se emplean actualmente en el tratamiento de asma.

Los fragmentos de anticuerpo monovalentes pueden mezclarse opcionalmente con vehículos y/o excipientes adecuados conocidos por los expertos en la materia.

La presente invención se entenderá más claramente a partir de la descripción adicional que se indica a continuación, que se refiere a ejemplos no limitantes de preparación y de uso de fragmentos de anticuerpos monovalentes de anticuerpos anti-FcαRI de acuerdo con la invención.

EJEMPLO 1: LA DIRECCIÓN DE FcαRI INHIBE LA FAGOCITOSIS MEDIADA POR IgG EN MONOCITOS DE SANGRE HUMANA *IN VITRO*

Se examinó la función de FcαRI en la modulación de la actividad fagocítica mediada por IgG de los monocitos de la sangre.

Las células mononucleares de sangre periférica humana se aislaron por centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Hypaque a partir de voluntarios sanos. Se obtuvieron poblaciones de monocitos enriquecidas (del 70 al 80%) por adherencia a plástico como se describe en MONTEIRO y col. (1990, mencionado anteriormente).

Se generaron fragmentos de Fab de un mAb anti-FcαRI (IgG1κ, clon A77, MONTEIRO y col., J. Immunol. 148: 1764-1770, 1992) y de un anticuerpo monoclonal de control irrelevante (IgG1κ, clone 320) (PASTORELLI y col., J. Biol. Chem. 276: 20407-20412, 2001) mediante la digestión de pepsina durante 8 h a 37°C seguido de reducción con cisteína 0,01 M y alquilación con yodoacetamina 0,15 M a pH 7,5. La digestión completa y la pureza se

controlaron por SDS-PAGE.

Las células mononucleares de sangre adherentes se incubaron previamente con 10 mg/ml de Fab A77 (c), Fab 320 irrelevante o tampón durante 30 min a 37°C. Después del lavado, las células se incubaron a 37°C durante 30 min con *E. coli* (50 bacterias/célula) (Molecular Probes, Eugène, Oregon) conjugado con Rojo Texas, opsonizado o no con anticuerpos policlonales IgG de conejo anti-*E. coli* (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, los portaobjetos se montaron y se examinaron con un microscopio confocal por láser (LSM 510 Carl Zeiss, Jena, Alemania). Se muestran la transmisión superpuesta y las imágenes fluorescentes (secciones centrales). Los paneles (a-d) son representativos de seis experimentos independientes. El número medio ($\pm$ SD) de bacterias ingeridas por monocito en seis experimentos con diferentes donantes sanos se muestra en la Figura 1. Se determinaron por recuento al menos tres campos en cada experimento. El número encima de la barra corresponde al porcentaje medio de inhibición por Fab, calculado según se indica a continuación: $100 - 100 \times (n \text{ de bacterias opsonizadas por IgG en presencia de Fab A77} - n \text{ de bacterias no opsonizadas}) / (n \text{ de bacterias opsonizadas por IgG} - n \text{ de bacterias no opsonizadas})$ en la que n indica el número medio de bacterias internalizadas.

Los resultados se muestran en la Figura 1.

Leyenda de la Figura 1:

Bacterias no opsonizadas (No ops.)

□ = tampón

Bacterias opsonizadas por IgG (ops. por IgG)

□ = tampón

■ = Fab anti-Fc α RI Fab A77

▨ = Fab 320 irrelevante

* $P < 0,02$, ensayo t de Student para muestras no relacionadas

Los resultados muestran que la opsonización de IgG mejoró la fagocitosis de *E. coli* por monocitos. La incubación previa con un fragmento Fab A77 anti-Fc α RI inhibió la fagocitosis mediada por IgG en más del 80% en comparación con el fragmento Fab 320 irrelevante.

EJEMPLO 2: CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN INHIBIDORA DE Fc α RI

La función inhibidora de Fc α RI se estudió adicionalmente ensayando la respuesta a la degranulación de la línea celular de mastocitos de rata RBL-2H3 que expresa constitutivamente el receptor de alta afinidad a IgE (Fc ϵ RI), transfectados con Fc α RI humano de tipo natural.

1) Material y procedimientos:

Transfección celular:

La transfección de células RBL-2H3 se realizó como se describe por LAUNAY y col. (1999, mencionado anteriormente): La construcción de Fc α RI humano de tipo natural se clonó en un vector pSR α NEO que contenía un gen de resistencia a la neomicina entre los sitios de restricción XbaI-BamHI y la secuencia se controló por secuenciación del ADN. Las células RBL-2H3, mantenidas como se describe por ROA y col. (J. Immunol. 159: 2815-2823, 1997), se transfectaron con 15 mg de ADN por electroporación a 250 V y 1500 μ Fa usando un aparato Easyjet⁺ (Eurogentec, Seraing, Bélgica).

Se seleccionaron clones resistentes a 1 mg/ml de G418 para la expresión de Fc α RI por citometría de flujo. Las células se incubaron previamente con 100 μ g de IgG humano policlonal (PharMingen, San Diego, California) para bloquear Fc γ Rs antes de la incubación con mAb anti-Fc α RI marcado con ficoeritrina (IgG1k, A59-PE) (MONTEIRO y col., 1992, mencionado anteriormente) o con un Ab irrelevante acoplado a isotipo (Becton Dickinson, Bedford, Massachussets). Después del lavado, las células se analizaron usando un citómetro de flujo FACScalibur y el software CellQuest (Becton Dickinson). Se seleccionó un clon que expresaba Fc α RI humano (clon 15.4) para los siguientes experimentos.

Respuesta a la degranulación

La exocitosis de los mediadores granulares contenidos en las células se determinó mediante la medición de la liberación de β -hexosaminidasa como se describe en (ROA y col., 1997, mencionado anteriormente), por las células transfectadas de Fc α RI, o por las células no transfectadas usadas como control, tras la sensibilización con

diferentes reactivos de ensayo.

Las células se colocaron en placas de 96 pocillos (Becton Dickinson) en 5×10^4 células/pocillo. Las células se sensibilizaron con diferentes reactivos de ensayo como se indica en lo sucesivo en este documento para cada reactivo. Las células se lavaron en tampón de Tyrode calentado previamente (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, glucosa 5,6 mM, HEPES 10 mM, pH 7,3, CaCl_2 1,8 mM, MgCl_2 1 mM y BSA al 5%), y la degranulación se desencadenó con 0,1 mg/ml de DNP-HAS (Sigma). La liberación neta de β -hexosaminidasa se calculó como un porcentaje del contenido total después de la sustracción de liberación espontánea.

2) Inhibición de exocitosis mediada por IgE por fragmentos Fa anti-Fc α RI

Se sensibilizaron transfectantes de Fc α RI humano (clon 15.4) y células RBL no transfectadas (NT) con IgE anti=DNP (1:200) o IgE anti-DNP más 10 mg/ml de control Fab 320 irrelevante o Fab A77 anti-Fc α RI durante 1 h a 37°C. Las células se lavaron, la degranulación se desencadenó con DNP-HSA y se determinó la liberación de β -hexosaminidasa.

Los resultados se muestran en la Figura 2a.

Leyenda de la Figura 2a:

Wt#15.4 = transfectantes de Fc α RI humano (clon 15.4)

NT = células RBL no transfectadas

□ = IgE

■ = IgE + Fab A77 anti-Fc α RI

▨ = IgE + Fab 320 irrelevante

* $P < 0,02$, ensayo t de Student para muestras no relacionadas

Los datos representan las medias $\pm$ SD de cinco experimentos independientes. El número encima de la barra corresponde al porcentaje medio de inhibición de degranulación.

Los resultados muestran que la estimulación antigénica transfectantes sensibilizados por IgE (clon 15.4) inducida por una fuerte respuesta a la degranulación. La incubación previa con Fab A77 anti-Fc α RI inhibió notablemente la degranulación iniciada por Fc α RI (74%), en comparación con un Fab 320 irrelevante. Se obtuvieron resultados similares con otros dos transfectantes (no mostrados) pero no con células no transfectadas (NT). El efecto inhibitorio de A77 Fab fue incluso más fuerte cuando se incubó previamente durante periodos de tiempo más largos (de 2 a 12 horas) (no mostrado).

Cabe destacar que el Fab anti-Fc α RI no pudo modificar la unión a IgE (no mostrado). El Fab anti-Fc α RI purificado por filtración en gel tuvo una acción inhibitoria similar, descartando una función de los agregados en los efectos observados (no mostrado).

3) Estudio de respuesta a la dosis de la inhibición mediada por Fab anti-Fc α RI

Se sensibilizaron transfectantes Fc α RI humanos (clon 15.4) con IgE en presencia de diferentes concentraciones de Fab A77 anti-Fc α RI de Fab 320 irrelevante durante 1 h a 37°C. Las células se lavaron, se desencadenó la degranulación con DNP-HSA y se determinó la liberación de β -hexosaminidasa.

Los resultados se muestran en la Figura 2b.

Leyenda de la Figura 2b:

■ = IgE + Fab A77 anti-Fc α RI

▨ = IgE + Fab 320 irrelevante

* $P < 0,02$, ensayo t de Student para muestras no relacionadas.

Los datos representan la media $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes.

Los resultados muestran que la inhibición por Fab anti-Fc α RI era dependiente de la concentración, y era máxima entre 1 y 10 μ g/ml.

4) Influencia de epítopo dirigida por Fab anti-Fc α RI en la inhibición

Se sensibilizaron transfectantes Fc α RI humanos (clon 15.4) con IgE en presencia de 10 mg/ml de fragmento de Fab a partir de diferentes mAb anti-Fc α RI: A3 (reconociendo un sitio de unión entre EC1 y EC2; reconociendo A59, A62, A77, un sitio de unión en EC2) o Fab 320 irrelevante durante 1 h a 37°C.

5 Las células se lavaron, la desgranulación se desencadenó con DNP-HSA, y se determinó la liberación de β -hexosaminidasa.

Los resultados se muestran en la Figura 2c.

Leyenda de la Figura 2c:

■ = Fab anti-Fc α RI (A3, A59, A62, A77)

▨ = Fab 320 irrelevante

10 * $P < 0,01$, ensayo t de Student para muestras no relacionadas

Los datos representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes.

Tres de los cuatro Fab anti-Fc α RI ensayados mostraron degranulación inducida por Fc ϵ RI por >50%. El cuarto experimento Fab anti-Fc α RI (A3) no pudo inhibir la degranulación, a pesar de que, al igual que sus tres homólogos, se une fácilmente a células Fc α RI-transfectadas (no mostradas).

5) Influencia de la valencia del ligando en la inhibición

Para este fin, se generaron F(ab')₂ a partir del mAb (A77) anti-Fc α RI o a partir del anticuerpo 320 irrelevante, mediante la digestión de pepsina durante 8 h a 37°C con una enzima a una proporción de sustrato (p/p) de 1/50 en tampón acetato 0,1 M, pH 4,4, como se describe en SILVAIN y col. (J. Immunol. 155: 1606-1618, 1995). La digestión completa y la pureza se controlaron por SDS-PAGE.

20 Se sensibilizaron transfectantes Fc α RI humanos (clon 15.4) con IgE o IgE más 10 μ g/ml de Fab o fragmentos F(ab')₂ de A77, o IgE más Fab irrelevante o fragmentos F(ab')₂ de 320, durante 1 h a 37°C.

Las células se lavaron, la degranulación se desencadenó con DNP-HSA y se determinó la liberación de β -hexosaminidasa.

Los resultados se muestran en la Figura 2d.

25 Leyenda de la Figura 2d:

□ = IgE

■ = IgE + A77 Fab o F(ab')₂

▨ = IgE + 320 Fab o F(ab')₂

* $P < 0,01$, ensayo t de Student para muestras no relacionadas

30 Los datos representan la media $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes.

Los resultados muestran que el Fab anti-Fc α RI monovalente tenía un efecto inhibitor más fuerte que los fragmentos F(ab')₂ divalentes.

6) Influencia de la agregación de Fc α RI en la degranulación celular

35 Se sensibilizaron transfectantes Fc α RI humanos (clon 15.4) con IgE, o 10 μ g/ml de Fab o fragmentos de F(ab')₂ de A77, o Fab irrelevante o fragmentos F(ab')₂ de 320, durante 1 h a 37°C.

Después, las células se estimularon con fragmentos F(ab')₂ de IgG de conejo anti-ratón (RAM a 40 μ g/ml) (LAU-NAY y col., J. Leukoc. Biol. 63: 636-642, 1998).

Las células se lavaron y se determinó la liberación de β -hexosaminidasa.

Los resultados se muestran en la Figura 2e.

40 Leyenda de la Figura 2e:

□ = IgE

■ = A77 Fab o F(ab')₂

▣ = 320 Fab o F(ab')₂

* $P < 0,02$, ensayo t de Student para muestras no relacionadas

Los datos representan la media $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes.

- 5 Los resultados muestran que la agregación altamente multivalente de Fc α RI, después del entrecruzamiento de F(ab')₂ anti-Fc α RI con Ig de conejo anti-ratón (RAM) F(ab')₂, dio como resultado la degranulación. La agregación multivalente menos extensiva con Fab anti-Fc α RI más RAM F(ab')₂ dio como resultado una degranulación más débil. No se observó degranulación con Fab anti-Fc α RI, F(ab')₂ o con solo RAM F(ab')₂ (no mostrado).

EJEMPLO 3: LA IgA SÉRICA INDUCE LA FUNCIÓN INHIBIDORA Fc α RI

- 10 El efecto del IgA del ligando fisiológico se ensayó en transfectantes Fc α RI RBL-2H3 (clon 15.4), ensayando la respuesta de la degranulación, como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior.

1) Influencia del tratamiento proteolítico sobre la respuesta inhibidora Fc α RI a IgA

- 15 Ya que IgA ejerce una actividad biológica en sitios inflamatorios, que contienen numerosos mediadores, incluyendo proteasas, se examinó el efecto del tratamiento de tripsina de las células sobre la función inhibidora mediada por IgA, dado que el Fc α RI es resistente a tripsina (MONTEIRO y col., 1990, mencionado anteriormente).

Se trataron previamente, o no, transfectantes Fc α RI con 1 mg/ml de tripsina-TCPK (Sigma) en DMEM durante 30 min a 37°C y después se sensibilizaron durante una noche con solo IgE, o con IgE más 0,2 mg/ml de IgG sérico, o IgA sérico purificado (lotes N° 39328 y 02828, ICN Biomedicals Inc, Aurora, Ohio).

- 20 Las células se lavaron, la degranulación se desencadenó con DNP-HSA y se determinó la liberación de β -hexosaminidasa.

Los resultados se muestran en la Figura 3a.

Leyenda de la Figura 3a:

□ = IgE

■ = IgE + IgA sérico

- 25 ▣ = IgE + IgG sérico

* $P < 0,01$, ensayo t de Student para muestras no relacionadas

Los datos representan la media $\pm$ SD de seis experimentos independientes.

Los números encima de las barras indican el porcentaje medio de inhibición.

- 30 Los resultados muestran que la incubación con IgA sérica, pero sin IgG, inhibieron significativamente la degranulación dependiente de IgE (43%). El efecto inhibitor del IgA sérico, pero no de IgG, se mejoró significativamente (mejora de -50%) en células tratadas con tripsina, mientras la respuesta a la degranulación mediada por IgE no se vio afectada. Se observó una mejora similar con mieloma IgA purificado (no mostrado).

2) Influencia de la concentración de Ig sobre la función inhibidora de Fc α RI

- 35 Se trataron previamente transfectantes Fc α RI humanos con 1 mg/ml de tripsina-TCPK (Sigma) en DMEM durante 30 min a 37°C y se sensibilizaron durante una noche con IgE sola o con IgE más diversas concentraciones de dos lotes de IgA sérica purificado (lotes N° 39328 y N° 02828, ICN Biomedicals Inc, Aurora, Ohio), IgA secretora (SIgA, lote N° 42K3780, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) o IgG humana.

Las células se lavaron, la degranulación se desencadenó con DNP-HSA y se determinó la liberación de β -hexosaminidasa.

- 40 Los resultados se muestran en la Figura 3b.

Leyenda de la Figura 3b:

◇ = IgE

■ = IgE + IgA sérica (lote N° 39328)

▲ = IgE + IgA sérica (lote N° 02828)

● = IgE + SIgA

□ = IgE + IgG

* $P < 0,01$, ensayo t de Student para muestras no relacionadas

5 Los datos representan la media $\pm$ SD de cinco experimentos independientes.

Los resultados muestran que los dos lotes diferentes de IgA sérica del mercado inhibieron la degranulación en una manera dependiente de la dosis, obteniéndose la inhibición máxima (66%) a 0,5 mg/ml. La SIgA de calostro también inhibió la activación celular, aunque a un nivel algo menor.

3) Modulación de la respuesta inhibidora de Fc α RI por IgA1 e IgA2

10 Ya que Fc α RI se une a tanto IgA1 como a IgA2, la capacidad inhibidora de las dos subclases se comparó con respecto a la de SIgA que contiene cantidades variables de tanto IgA1 como de IgA2 dependiendo del tipo de mucosa secretora.

15 Se trataron previamente transfectantes Fc α RI humanos con 1 mg/ml de tripsina-TCPK (Sigma) en DMEM durante 30 min a 37°C y se sensibilizaron durante una noche con IgE más 0,2 mg/ml de IgG sérica, mieloma IgA1 e IgA2 purificada o SIgA. Las células se lavaron, la degranulación se desencadenó con DNP-HSA y se determinó la liberación de β -hexosaminidasa.

Los resultados se muestran en la Figura 3c.

Leyenda de la Figura 3c:

□ = IgG

20 ■ = IgA1, IgA2 o SIgA

* $P < 0,02$, ensayo t de Student para muestras no relacionadas

Los datos representan la media $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes.

25 Los resultados muestran que todas las preparaciones ensayadas produjeron una inhibición significativa (30-40%) con respecto a la IgG humana (<5%). La respuesta inhibidora de Fc α RI puede inducirse por tanto IgA1 como IgA2.

4) Comparación de la inhibición de la IgA sérica polimérica y monomérica

Ya que el Fc α RI se une a IgA polimérica más eficazmente que la IgA monomérica, se examinó el potencial inhibidor de las diversas formas moleculares de IgA (separadas por HPLC), sin entrecruzamiento secundario.

30 Se trataron previamente transfectantes Fc α RI humanos con 1 mg/ml de tripsina-TCPK (Sigma) en DMEM durante 30 min a 37°C y se sensibilizaron durante una noche con IgE más 0,1 mg/ml de IgG sérica (IgG), IgA sérica total (IgA), IgA sérica polimérica (pIgA), IgA sérica dimérica (dIgA) o IgA sérica monomérica (mIgA). La IgA sérica se fraccionó por tamaño por HPLC.

Las células se lavaron, la degranulación se desencadenó con DNP-HSA y se determinó la liberación de β -hexosaminidasa.

35 Los resultados se muestran en la Figura 3d.

Leyenda de la Figura 3d:

□ = IgG

■ = IgA, pIgA, dIgA o mIgA

recuadro = IgA sérica fraccionada por tamaño por HPLC

40 * $P < 0,02$, ensayo t de Student para muestras no relacionadas

Los datos representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes.

Los resultados muestran que IgA sérica polimérica es más inhibidora que la IgA sérica monomérica. La potencia inhibidora aumentó con el tamaño de las especies de IgA: las IgA poliméricas era más eficaces (60%) que

tanto la IgA dimérica (38%) como la IgA monomérica (20%). Se obtuvieron datos similares con un lote diferente de IgA sérica separado por HPLC (no mostrado).

La diferencia entre A77 mAb y IgA puede explicarse mediante el sitio de unión y la avidéz del ligando. Mientras que el sitio de unión de mAb A77 anti-Fc α RI se localiza en EC2, IgA interactúa con el dominio EC1 (MORTON y col., J. Exp. Med. 189: 1715-1722, 1999) y la IgA polimérica se une más ávidamente a Fc α RI que la IgA monomérica (HERR y col., 2003, mencionado anteriormente; WINES y al., 1999, mencionado anteriormente). No se observó liberación de β -hexosaminidasa cuando se incubaron diferentes preparaciones de IgA solo con células RBL-2H3 transfectadas, y la degranulación mediada por IgE no se inhibió en células no transfectadas (NT) (no mostrado).

EJEMPLO 4: LA SEÑAL INHIBIDORA DE Fc α RI ESTÁ MEDIADA POR EL MOTIVO ITAM DE LA CADENA FcR γ

Para explorar los requisitos estructurales para la señal inhibidora se usó una serie de mutantes de Fc α RI y construcciones quiméricas:

- Fc α RI_{R209L} en el que la arginina cargada en la posición 209, en el dominio transmembrana Fc α RI, se reemplaza por una leucina (R209L); esta mutación elimina la asociación de Fc α RI con la cadena FcR γ (LAU-NAY y col., 1999, mencionado anteriormente; MORTON y col., J. Biol. Chem. 270: 29781-29787, 1995).
- La construcción R209L/ γ quimera se obtiene a partir de la fusión de los dominios extracelular y transmembrana R209L de Fc α RI_{R209L} a la cola intracitoplasmática de la cadena FcR γ humana.

La R209L/ γ quimera se generó como se indica a continuación. Los dominios extracelular y transmembrana del mutante R209L se amplificaron por PCR usando cebadores F_{wt}: GGGCTCGAGATGGACCCAAACAGACCACC (SEQ ID NO: 1) y R γ - α : CTTTCGCACTTGGATCTTCAGATTTTCAACCAGTATGGCCAA (SEQ ID NO: 2), así como el dominio intracelular de Fc α R humano γ = cadena usando los cebadores F γ - α : TTGGCCATACTGGTTGAAAATCTGAAGATCCAA GTGCGAAAG (SEQ ID NO: 3) y R γ : GGGGGATCCTTACTGTGGTGGTTTC TCATG (SEQ ID NO: 4). Los productos de PCR se fusionaron solapando PCR de extensión.

Las estructuras del receptor Fc α RI- γ 2 de tipo natural, del receptor Fc α RI_{R209L}, y del receptor R209L/ γ quimera se representan esquemáticamente en la Figura 4a.

Todas las construcciones se clonaron en el vector pSR α Neo y se transfectaron en células RBL-2H3, como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Se seleccionaron células transfectadas con Fc α RI humano de tipo natural (clon 15.5), Fc α RI- γ 2 (clon 5.26) o la construcción R209L/ γ quimera (clon 9.4).

Los resultados de la determinación de la expresión Fc α RI por citometría de flujo se muestran en la Figura 4b. Estos resultados muestran que todos los transfectantes RBL-2H3 expresaron niveles significativos de Fc α RI en toda la superficie celular.

La respuesta a la degranulación se ensayó como se ha descrito en el Ejemplo 2 2).

Los resultados se muestran en la Figura 4c.

Legenda de la Figura 4c:

□ = IgE

■ = IgE + Fab 320 irrelevante

▣ = IgE + Fab A77 anti-Fc α RI

* $P < 0,02$, ensayo t de Student para muestras no relacionadas

Los números encima de las barras indican el porcentaje de inhibición en comparación con un control Fab irrelevante.

Los resultados muestran que todos los transfectantes sensibilizados con IgE sola mostraron alrededor del 50% de degranulación mediada por Fc ϵ RI. El tratamiento de Fab A77 anti-Fc α RI no fue inhibidor en RBL-2H3 transfectado con el mutante R209L (clon 5.26) indicando que la cola intracelular de Fc α RI no contenía el motivo responsable de la señalización inhibidora. En contraste, la unión de Fab A77 anti-Fc α RI al receptor Fc α RI_{R209L}/ γ quimérico en células transfectadas (clon 9.4) restauró el efecto inhibidor en la degranulación en una extensión similar a la que se observó en las células transfectadas con el receptor del tipo natural (clon 15.5) (al 91%

y al 72%, respectivamente). Se obtuvieron resultados similares con al menos tres clones más para cada tipo de transfectantes (no mostrado).

La agregación de este receptor $\text{Fc}\alpha\text{RI}_{\text{R209L}/\gamma\text{quimérico}}$ indujo la degranulación, demostrando que, al igual que el $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ de tipo natural, era capaz de mediar tanto la activación como la inhibición (no mostrado).

5 Ya que la cadena $\text{FcR}\gamma$ no tiene ningún motivo inhibitor conocido, el ITAM $\text{FcR}\gamma$ normalmente conocido como un motivo activador se investigó para saber si también puede mediar el efecto inhibitor. La cadena $\text{FcR}\gamma$ humana contiene dos tirosinas de terminal carboxi (Y268 e Y278 en el receptor $\text{Fc}\alpha\text{RI}_{\text{R209L}/\gamma\text{quimérico}}$) que son parte del motivo ITAM que se sabe que tiene una función en la activación celular (17,24). Se introdujeron mutaciones puntuales (Y268F, Y278F y Y268/278F doble) en un motivo ITAM del $\text{Fc}\alpha\text{RI}_{\text{R209L}/\gamma\text{quimera}}$.

10 Los transfectantes estables (simples o dobles) se establecieron en células RBL-2H3 transfectadas con el $\text{R209L}/\gamma\text{quimera}$ que contenía mutaciones Y268F y/o Y278F en el motivo ITAM que ya no eran capaces de mediar la respuesta inhibitor o activadora (no mostrado).

EJEMPLO 5: LA SEÑAL INHIBIDORA $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE TIROSINA Y AFECTA A LA AFLUENCIA DE Ca^{2+}

15 A) Ensayo de fosforilación de tirosina

Ya que la señalización mediada por ITAM implica la activación de tirosina quinasas, se investigó la dirección monomérica del complejo $\text{Fc}\alpha\text{RI}/\gamma$ para saber si está implicado en la fosforilación de tirosina.

20 Los transfectantes RBL indicados ($\text{Fc}\alpha\text{RI}$ -72, $\text{Fc}\alpha\text{RI}_{\text{R209L}/\gamma\text{quimera}}$ de tipo natural Y268F/Y278F $\text{Fc}\alpha\text{RI}_{\text{R209L}/\gamma\text{quimera}}$) durante 15 min con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Fab A77 anti- $\text{Fc}\alpha\text{RI}$, Fab 320 irrelevante, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RAM F(ab')_2 o una combinación de anti- $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ A77 F(ab')_2 más RAM F(ab')_2 .

25 Después de la estimulación y dos lavados en PBS enfriado con hielo, las células se solubilizaron en tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,1%, NaF 50 mM, NaCl 50 mM, Na_3VO_4 1 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 30 mM, 50 U/ml de aprotinina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina) y se prepararon sobrenadantes post-nucleares. Los lisados se resolvieron por SDS-PAGE al 10% y las proteínas se transfirieron sobre una membrana PVDF. Después del bloqueo en BSA al 4%, las membranas se incubaron con 4G10 anti-PY Ab (Upstate Biotechnology Lake Placid, NY) durante 1 h a temperatura ambiente y con Ig de cabra anti-ratón acoplada a HRP (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). Después, las membranas se dividieron y se sondaron de nuevo con escramblasa fosfolipídica anti-rata (PLSCR) mAb (PASTORELLI y col., 2001, mencionado anteriormente) para evaluar una carga igual. Los filtros se desarrollaron por ECL (Amersham-Pharmacia Biotech).

30 Los resultados se muestran en la Figura 5.

Leyenda de la Figura 5:

* indica proteínas fosforiladas prominentes de tirosina en células estimuladas.

35 Los resultados muestran que la incubación de los transfectantes $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ con Fab A77 anti- $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ indujeron la aparición de varias proteínas fosforiladas con tirosina en comparación con Fab irrelevante de control. El patrón de fosfo-proteínas parecía idéntico al obtenido después de la agregación multimérica de $\text{Fc}\alpha\text{RI}$, diferenciándose todavía en su intensidad. Se obtuvieron datos similares con el receptor $\text{Fc}\alpha\text{RI}_{\text{R209L}/\gamma\text{quimérico}}$, mientras que las mutaciones en ITAM anularon la capacidad de este receptor para iniciar la fosforilación de tirosina después de tanto el direccionamiento monomérico como multimérico.

B) Medición de calcio citosólico

40 Se examinó la modulación de las etapas activadoras con respecto al efecto de Fab A77 anti- $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ en la afluencia de calcio citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), que es un mensajero claro para la activación celular.

1) Protocolo experimental

45 Se sensibilizaron alícuotas ($1,5 \times 10^6$ células) de transfectantes $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ humanos, o de células RBL-2H3 sin transfectar con diferentes reactivos de ensayo (indicados en lo sucesivo en este documento para cada experimento), en DMEM completo suplementado con HEPES 20 mM a pH 7,6 durante 1 h a 37°C. Después, las células se cargaron con 4 mM de la sonda fluorescente FURA-2-AM (Molecular probes, Leiden, Los Países Bajos) durante 30 min a 37°C.

50 Después de los lavados, se volvieron a suspender células a 1×10^6 células/ml en PBS que contiene CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1 mM, 0,5 mg/ml de gelatina y se pusieron en un cuenco agitado y termostatzado. Las células se activaron mediante la adición de 0,1 mg/ml de antígeno DNP-HAS (Ag) o taspigargina 50 nM (Sigma). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se calculó usando el software de ordenador suministrado con el espectrofluorímetro (Hitachi F 2000, Salem, New

Hampshire) de acuerdo con la fórmula proporcionada por GRYNKIEWICZ y col. (J. Biol. Chem. 260: 3440-3450, 1985). No se observó una auto-fluorescencia celular significativa, y los compuestos usados no se alteraron la fluorescencia FURA-2-AM. La contribución de acumulaciones intracelulares se determinó después de la estimulación en presencia de EGTA 3,5 mM. Para los estudios de inactivación de fluorescencia, se añadió Mn^{2+} (200 mM) a células incubadas medio libre de Ca^{2+} (BERTHON y col., Biochem. Pharmacol. 47: 789-794, 1994).

2) Inhibición de la fase meseta de Ca^{2+} mediante Fab Fc α RI

Los transfectantes humanos Fc α RI (a, clon 15.4) y las células RBL-2H3 sin transfectar (b) se sensibilizaron con IgE sola o con IgE más 10 μ g de Fab A77 anti-Fc α RI o Fab 320 irrelevante.

Los resultados se muestran en las Figuras 6a y 6b.

Leyenda de las Figuras 6a y 6b:

a = transfectantes Fc α RI humanos

b = células RBL-2H3 sin transfectar

Ag: estimulación con antígeno DNP-HAS

$\square$ = IgE sola

O = IgE + Fab A77 anti-Fc α RI

Δ = IgE + Fab 320 irrelevante

Los datos son representativos de al menos tres experimentos separados.

El pico de calcio intracelular después de la estimulación Fc α RI no se vio afectado (Fig. 6a, $\square$), pero la fase meseta del $[Ca^{2+}]_i$ elevado se inhibió notablemente después de la preincubación de transfectantes Fc α RI con Fab A77 anti-Fc α RI (Fig. 6a, O), en comparación con un Fab de control irrelevante (Fig. 6a, Δ) o células no transfectadas (Fig. 6b).

3) Efecto de Fab anti-Fc α RI en la liberación de acumulaciones de Ca^{2+} intracelulares

Se sensibilizaron transfectantes Fc α RI humanos (clon 15.4) con IgE sola o con IgE más 10 μ g/ml de Fab A77 anti-Fc α RI o Fab 320 irrelevante. Después, las células se cargaron con FURA-2-AM según se indica y el calcio extracelular se sometió a quelación con 3,5 mM EGTA en poco tiempo antes de determinar $[Ca^{2+}]_i$ para diferenciar entre la liberación de calcio de las acumulaciones intracelulares y la entrada de calcio del medio externo. Los resultados se muestran en la Figura 6c.

Leyenda de la Figura 6c:

Ag : estimulación con antígeno DNP-HAS

$\square$ = IgE sola

O = IgE + Fab A77 anti-Fc α RI

Δ = IgE + Fab 320 irrelevante

Los datos son representativos de al menos tres experimentos separados.

Los resultados muestran que el tratamiento de Fab A77 anti-Fc α RI no tenían efecto sobre las células tratadas con EGTA indicando que no se inhibió la liberación de acumulaciones de calcio intracelulares.

4) Fab anti-Fc α RI inhibe la afluencia de Ca^{2+}

Para confirmar que únicamente se vio afectada la afluencia de calcio, se reemplazó el Ca^{2+} externo con Mn^{2+} , que introduce células a través de los canales de calcio operados por acumulación (SOC) y compite con el calcio libre interno, inactivando por lo tanto la fluorescencia FURA-2-AM (BERTHON y col., 1994, mencionado anteriormente).

Se sensibilizaron transfectantes Fc α RI humanos (clon 15.4) se sensibilizaron con IgE sola (d) o con IgE más 10 μ g/ml Fab A77 anti-Fc α RI (e) o Fab 320 irrelevante (f).

Los resultados se muestran en las Figuras 6d-f.

Leyenda de las Figuras 6d-f:

Ag: estimulación con antígeno DNP-HAS

Mn: adición de Mn^{2+}

d = IgE sola

e = IgE + Fab A77 anti- $Fc\alpha RI$

5 f = IgE + Fab 320 irrelevante

10 Los datos son representativos de al menos tres experimentos separados. Los resultados muestran que la adición de Mn^{2+} disminuyó la fluorescencia, debido a la entrada espontánea de iones de Mn^{2+} en células. La estimulación $Fc\epsilon RI$ indujo un descenso significativo adicional de la fluorescencia como consecuencia de la afluencia de Mn^{2+} a través de los SOC abiertos (Fig. 6d). La incubación celular con anti- $Fc\alpha RI$ A77 anterior a la estimulación dependiente de IgE anuló este efecto (Fig. 6e), mientras que fue ineficaz un Fab 320 irrelevante (Fig. 6f).

Ag indujo la inactivación de la fluorescencia FURA-2-AM, debido a la afluencia de Mn^{2+} , con pendientes correspondientes a la entrada de calcio antes y después de la estimulación de 2,5 y 4,1 (d), 1,8 y 1,9 (e), y 3,5 (f).

5) Fab Anti- $Fc\alpha RI$ inhibe acontecimientos entre la liberación de calcio de las acumulaciones internas y la apertura de SOC

15 Para investigar si los acontecimientos dirigidos de inhibición mediada por $Fc\alpha RI$ entre la liberación de calcio de las acumulaciones internas y la afluencia de calcio, se usó tapsigargina, un agente farmacológico que consume las acumulaciones sensibles a inositol trifosfato, dando como resultado la apertura de SOC, en ausencia del acoplamiento del receptor transmembrana (THASTRUP y col., Agents Actions 27: 17-23, 1989).

20 Se sensibilizaron transfectantes $Fc\alpha RI$ humanos (clon 15.4) (g) y células RBL-2H3 sin transfectar (h) con 10 $\mu g/ml$ de Fab A77 anti- $Fc\alpha RI$ o Fab 320 irrelevante. Después de cargar las células con FURA-2-AM, se midió el $[Ca^{2+}]_i$ seguido de la estimulación 50 nM de tapsigargina (Tg).

Los datos son representativos de al menos tres experimentos separados.

Los resultados se muestran en las Figuras 6 g y 6h.

Leyenda de las Figuras 6 g y 6h:

25 g = transfectantes $Fc\alpha RI$ humanos

h = células RBL-2H3 sin transfectar

Tg: estimulación con tapsigargina

O = Fab A77 anti- $Fc\alpha RI$

Δ = Fab 320 irrelevante

30 Los resultados muestran que la elevación del $[Ca^{2+}]_i$ sostenida inducida por tapsigargina se redujo notablemente por preincubación con Fab A77 anti- $Fc\alpha RI$ en células transfectadas $Fc\alpha RI$, en comparación con Fab 320 irrelevante o células sin transfectar (Fig. 6h).

EJEMPLO 6: LA DIRECCIÓN $Fc\alpha RI$ PREVIENE LAS MANIFESTACIONES MEDIADAS POR IgE DE ASMA *IN VIVO*

35 Al demostrarse la actividad inhibidora de $Fc\alpha RI$ *in vitro*, la dirección *in vivo* de este receptor se ensayó para saber si pueden inhibir respuestas inflamatorias.

40 Ya que los ratones no expresan homólogos de $Fc\alpha RI$ (KABAGAWA y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 94: 5261-5266, 1997; HAYAMI y col., J. Biol. Chem. 272: 7320-7327, 1997), se usaron ratones transgénicos Balb/c (Tg) que expresaban el $Fc\alpha RI$ humano (CD89, línea 83) bajo el control del promotor CD11b, produciendo una expresión de células mieloides similar a la observada en seres humanos (LAUNAY y col., J. Exp. Med. 191: 1999-2009, 2000). Se realizó el genotipado por PCR (LAUNAY y col., 2000, mencionado anteriormente). Los ratones se criaron y se mantuvieron en las instalaciones para ratones de IFR 02 y Bichat Medical School. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices nacionales.

45 Se ensayó la inmunoterapia de Fab anti- $Fc\alpha RI$ en un modelo animal mediado por IgE de asma de acuerdo con ZUBERI y col. (J. Immunol. 164: 2667-2673, 2000), cuyo protocolo se adoptó. En resumen, se inmunizaron por vía intraperitoneal dos veces ratones Balb/c $Fc\alpha RI$ -transgénicos (Tg) y controles de crías silvestres (Lt) con 10 μg de TNP-OVA (Sigma) en 2 mg de gel de hidróxido de aluminio por 25 g de peso corporal los días 0 y 7. Al empezar el

día 14, los ratones se estimularon por vía intranasal a diario durante 7 días consecutivos con PBS o 2 mg de TNP-OVA complejo con 20 µg de anti-DNP IgE (IC) en presencia de 5 mg de Fab A77 anti-FcαRI o Fab 320 irrelevante. El día 14, los ratones recibieron 50 µg de Fab A77 anti-FcαRI o Fab de control por vía intraperitoneal. Doce horas después de la estimulación intranasal final, se pusieron ratones conscientes sin restricciones en una cámara de un pletismógrafo corporal de cuerpo entero (BUXCO Electronics, Sharon, CT). Después de la estabilización durante unos minutos, se administró un aerosol de metacolina 300 mM durante 60 s.

Los cambios en la resistencia de las vías respiratorias se calculó cada minuto durante 20 min después de la exposición a la metacolina, como se indica a continuación: pausa mejorada (Penh) = [(tiempo espiratorio/tiempo de relajación)-1] x (flujo de pico espiratorio/flujo de pico inspiratorio) (ZUANY-AMORIM y col., Science 280:

1265-1267, 1998).

Los resultados se muestran en la Figura 7a.

Leyenda de la Figura 7a:

◇ = Tg PBS

● = Tg IC + Fab A77 anti-FcαRI

▲ = Tg IC + Fab 320 irrelevante

▨ = Lt IC + Fab A77 anti-FcαRI

Las curvas representan la resistencia media de las vías respiratorias.

Las áreas acumulativas bajo la curva (AUC), de los valores Penh correspondientes eran la media ±SD de tres experimentos distintos que implicaban al menos ocho ratones por grupo, y se representaron gráficamente.

Los resultados se muestran en la Figura 7b.

Leyenda de la Figura 7b:

□ = Tg PBS

▨ = Tg IC + Fab 320 irrelevante

■ = Tg IC + Fab A77 anti-FcαRI

□ = Lt IC + Fab A77 anti-FcαRI

* $P < 0,05$, ensayo t de Student para muestras no relacionadas.

Los resultados muestran que después de la estimulación intranasal repetida con complejos inmunes de IgE en presencia de un Fab irrelevante, los ratones (FcαRI⁺) Tg desarrollaron hiperactividad bronquial a la metacolina inhalada, en comparación con los sus homólogos estimulados con PBS (Fig. 7a, 7b). Este fenómeno se anuló por el tratamiento de ratones transgénicos con Fab anti-FcαRI (Fig. 7a, 7b). La hiperactividad bronquial no se redujo por Fab anti-FcαRI en el control de crías silvestres (FcαRI⁻) no transgénicas (Fig. 7a, 7b).

Se realizó un análisis morfológico de las secciones de tejido pulmonar de ratones transgénicos FcαRI. Los animales se anestesiaron; los pulmones se inflaron por inyección traqueal de 1 ml de Compuesto a Temperatura de Corte Óptima (BDH, Poole, Reino Unido), fijo en paraformaldehído al 4%, deshidratado en alcoholes graduados y embebido en parafina. La evaluación histopatológica comparativa del grado de inflamación se realizó sobre todas las secciones pulmonares tintadas con H&E.

Los resultados se muestran en la Figura 7c-k.

Leyenda de la Figura 7c-k:

c-e = control de ratones estimulados con PBS

f-h = ratones estimulados con antígeno tratados con Fab 320 irrelevante

i-k = ratones estimulados con antígeno tratados con Fab A77 anti-FcαRI

Aumento x 10 (c, f, i), x 100 (d, e, g, h, j, k)

La histología pulmonar de ratones Tg estimulados con antígeno tratados con el Fab 320 irrelevante mostró infiltrados inflamatorios peribronquiales (Fig. 7f) y epiteliales (Fig. 7 g) que consistían principalmente en granulocitos

y celulares mononucleares, y congestión alveolar capilar difusa (Fig. 7h) (véase las flechas). Estas características estaban ausentes en los pulmones a partir de ratones estimulados con PBS (Fig. 7c-e) que mostraban la fisiología normal. Los ratones tratados con Fab A77 anti-Fc α RI estimulados con antígeno mostraron sustancialmente menos inflamación y congestión (Fig. 7i-k). La administración de Fab anti-Fc α RI evitó la congestión e inflamación de las vías respiratorias inducidas por antígeno por células inflamatorias.

No se observaron efectos en los pulmones de crías silvestres (Fc α RI^{-/-}) tratados con Fab anti-Fc α RI (no mostrado).

EJEMPLO 7: EFECTOS DE LA DIRECCIÓN Fc α RI EN LA INFLAMACIÓN RENAL NO INMUNE

También se ensayó la inmunoterapia de anti-Fc α RI después de la obstrucción ureteral unilateral (UUO) en ratones, un modelo inflamatorio de fibrosis renal intersticial y nefropatía obstructiva (KLAHR y MORRISSEY, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 283(5): F861-875, 2002). Los riñones se caracterizaron por dilatación tubular, infiltración de células inflamatorias, tales como macrófagos, y transición epitelial-mesenquimal del riñón. En resumen, la obstrucción unilateral o el uréter del riñón izquierdo se realizó en ratones Tg CD89 anestesiados por ligación en dos ubicaciones. Un día antes y diariamente después de la intervención quirúrgica, los ratones se trataron con PBS, 100 mg de Fab 320 irrelevante o 100 mg de Fab A77. El día 6, los ratones se sacrificaron y el riñón obstruido se procesó para su evaluación histopatológica (tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) y tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-CD11b).

Los resultados se muestran en la Figura 8.

Leyenda de la Figura 8:

Tg CD89 PBS = riñones obstruidos de ratones Tg CD89 tratados con PBS

Tg CD89 + Fab 320 = riñones obstruidos de ratones Tg CD89 tratados con Fab 320 irrelevante

A CD89 + FabA77 = riñones obstruidos de ratones Tg CD89 tratados con Fab A77

Los riñones tratados con PBS muestran características patológicas típicas de UUO con túbulos dilatados e infiltración celular (tinción PAS, no mostrado), notablemente macrófagos (tinción anti-CD11b). Estas características patológicas típicas estaban casi ausentes en riñones tratados con Fab A77 e la infiltración celular descendió considerablemente. No se observaron efectos en los riñones de los ratones Tg CD89 tratados con Fab 320.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)

<120> Ligando monovalente del receptor Fc α RI como un agente antiinflamatorio

<130> MJPh598/79

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador PCR

<400> 1

gggctcgaga tggaccccaa acagaccacc

<210> 2

<211> 42

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> cebador PCR

<400> 2

5 ctttcgcaact tggatcttca gattttcaac cagtatggcc aa 42

<210> 3

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> cebador PCR

<400> 3

ttggccatac tggttgaaaa tctgaagatc caagtgcgaa ag 42

<210> 4

15 $\langle 211 \rangle$ 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> cebador PCR

20 <400> 4

gggggacct tactgtgtg gtttctcatg 30

REIVINDICACIONES

1. Uso de un fragmento de anticuerpo monovalente dirigido frente al dominio EC2 del receptor Fc α RI, como principio activo antiinflamatorio para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad antiinflamatoria.
- 5 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad antiinflamatoria se selecciona entre lupus, artritis reumatoide, diabetes, nefritis, fibrosis renal intersticial, nefropatía obstructiva y trastornos inflamatorios intestinales.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad es una enfermedad alérgica.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha enfermedad alérgica es asma.

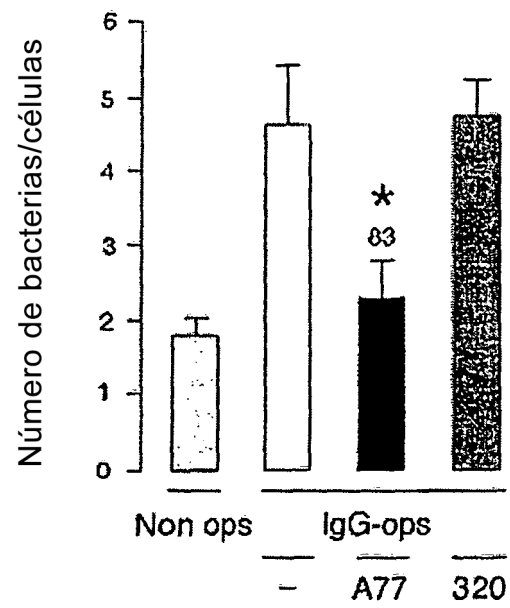


FIG. 1

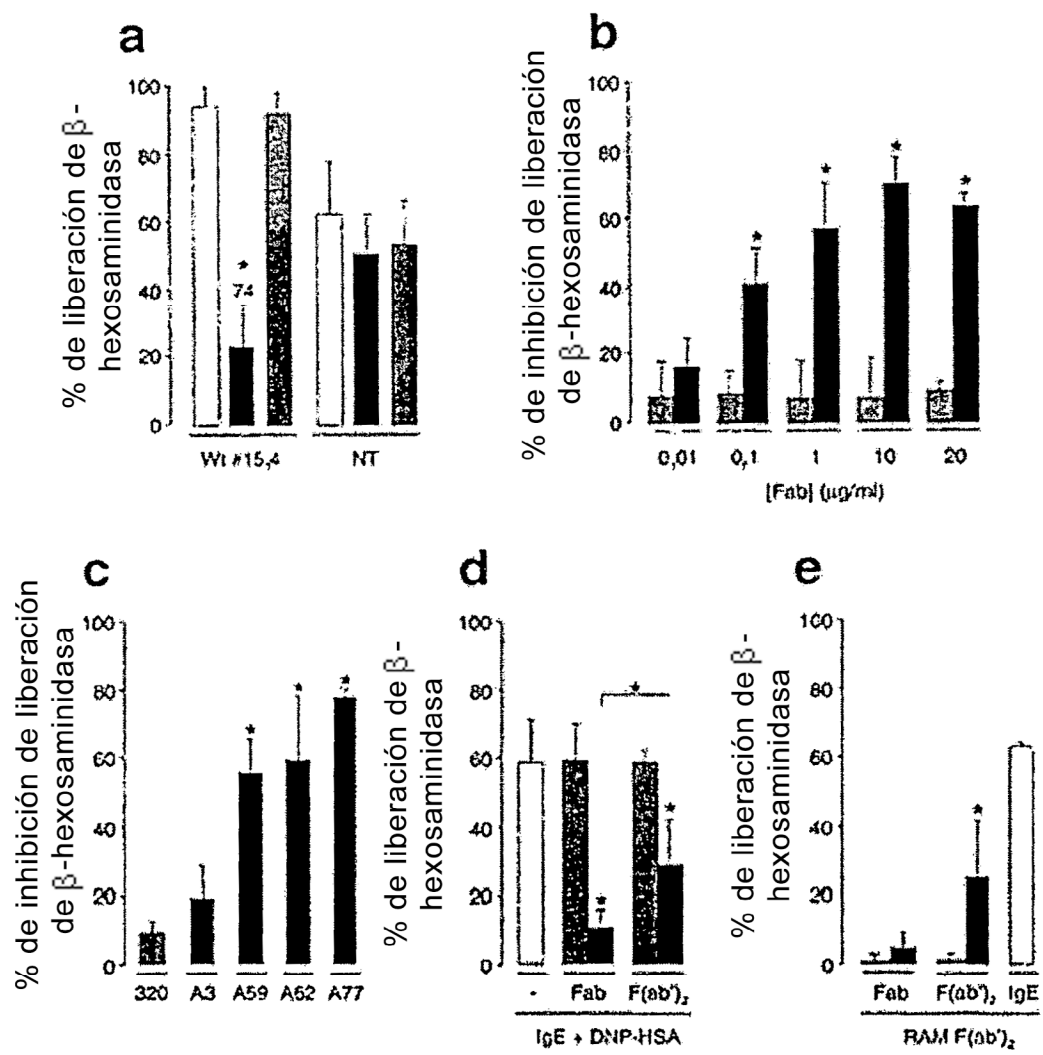


FIG. 2

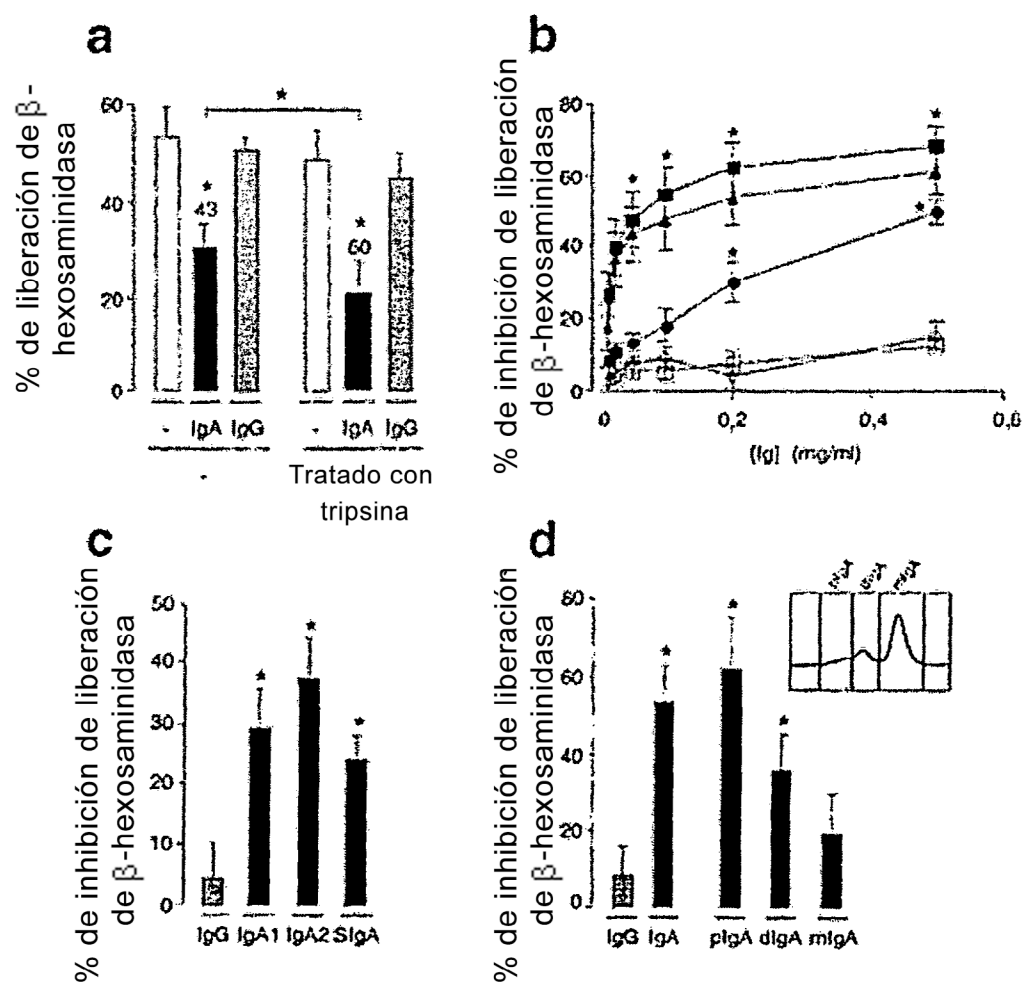


FIG. 3

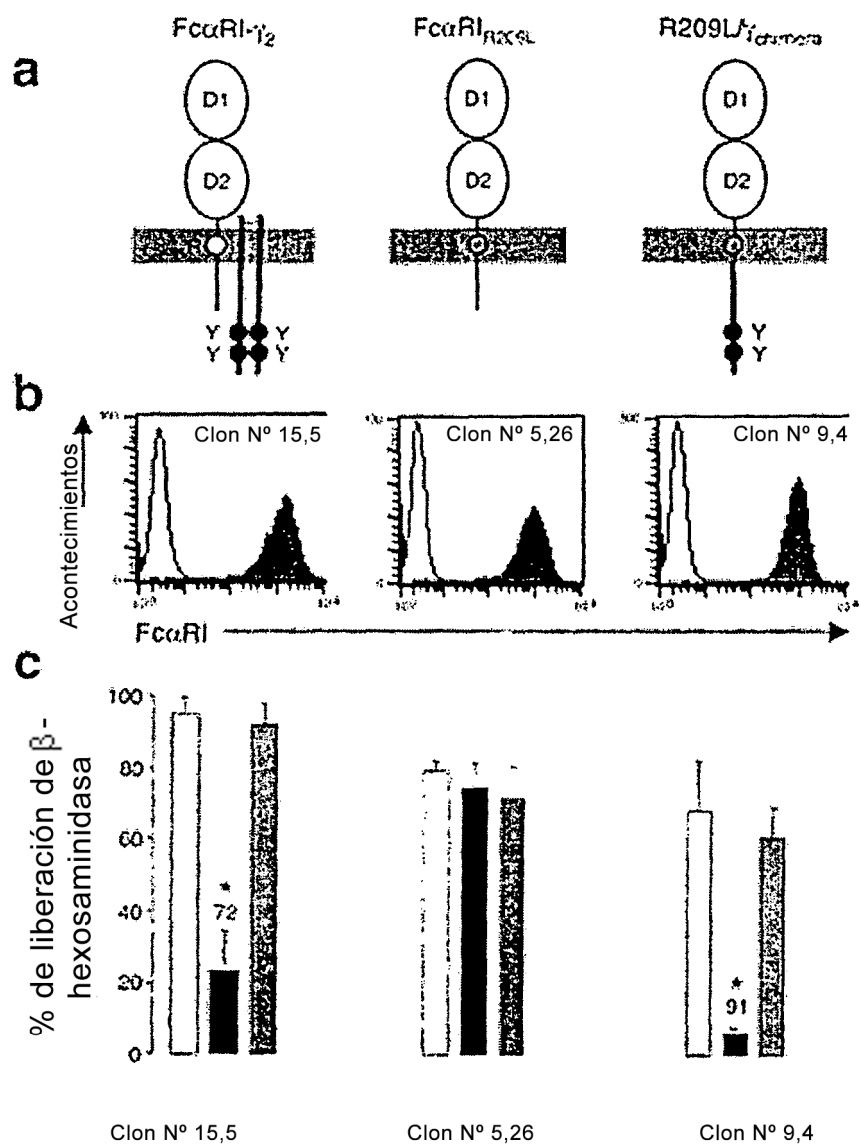


FIG. 4

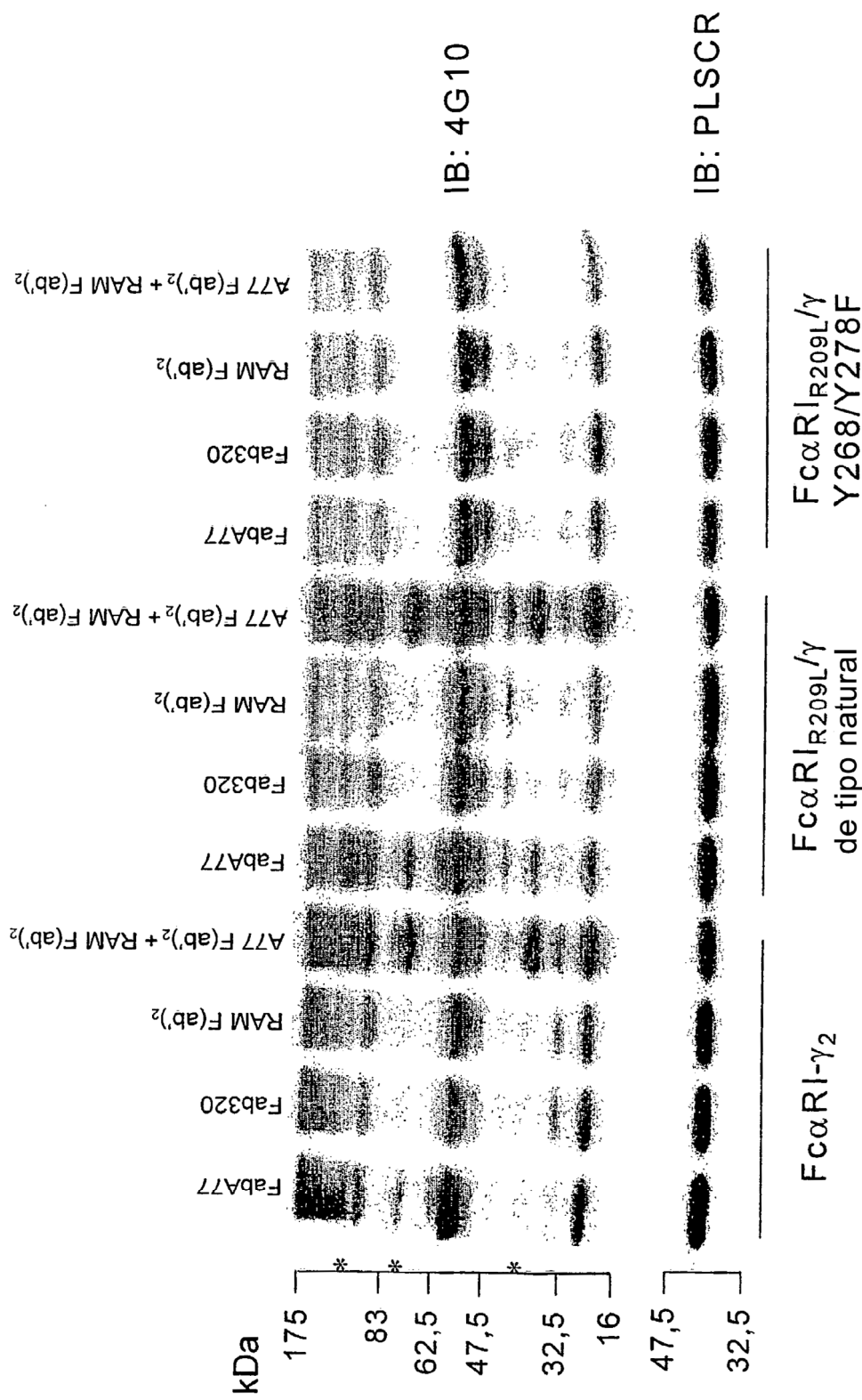


FIG. 5

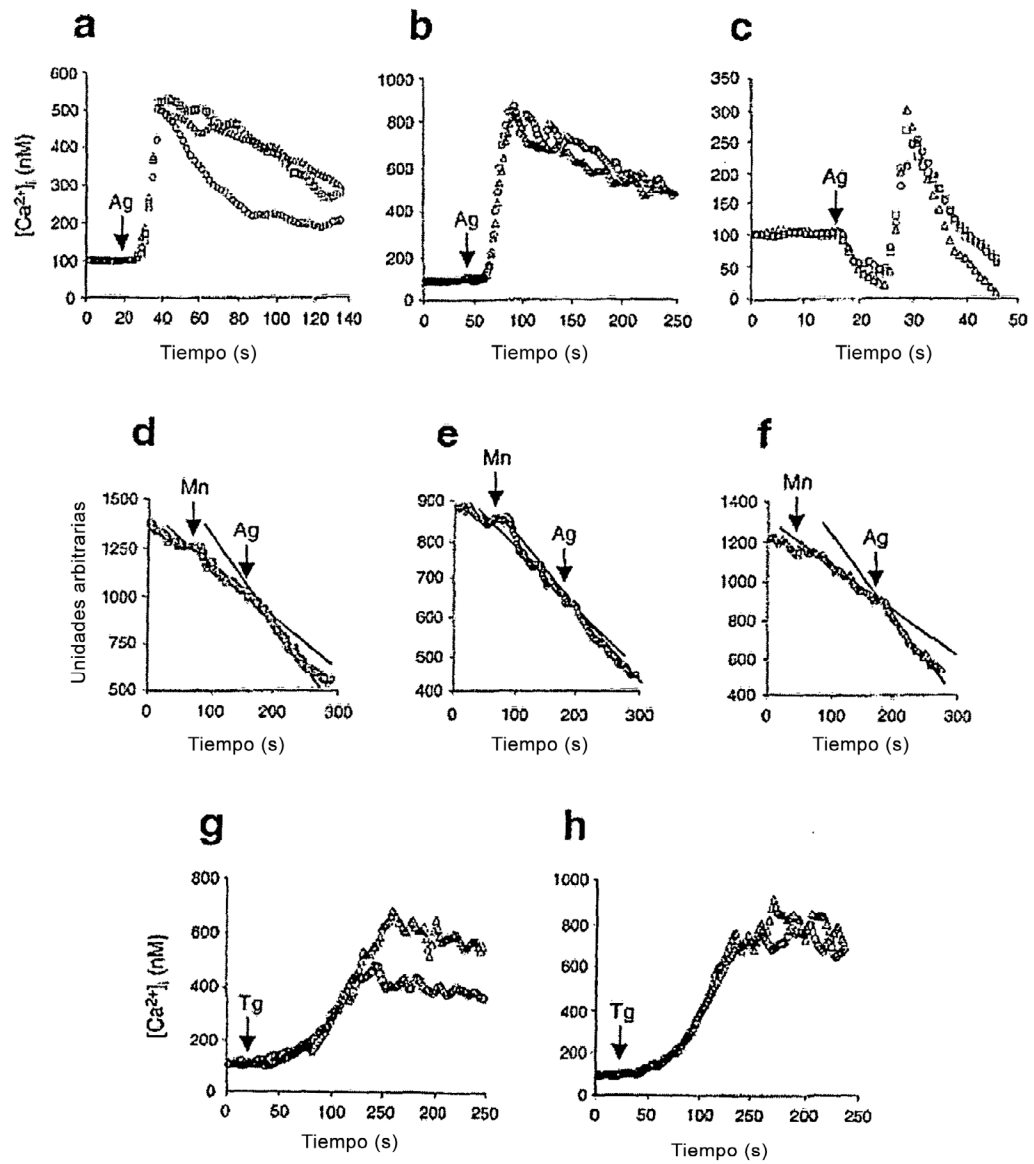


FIG. 6

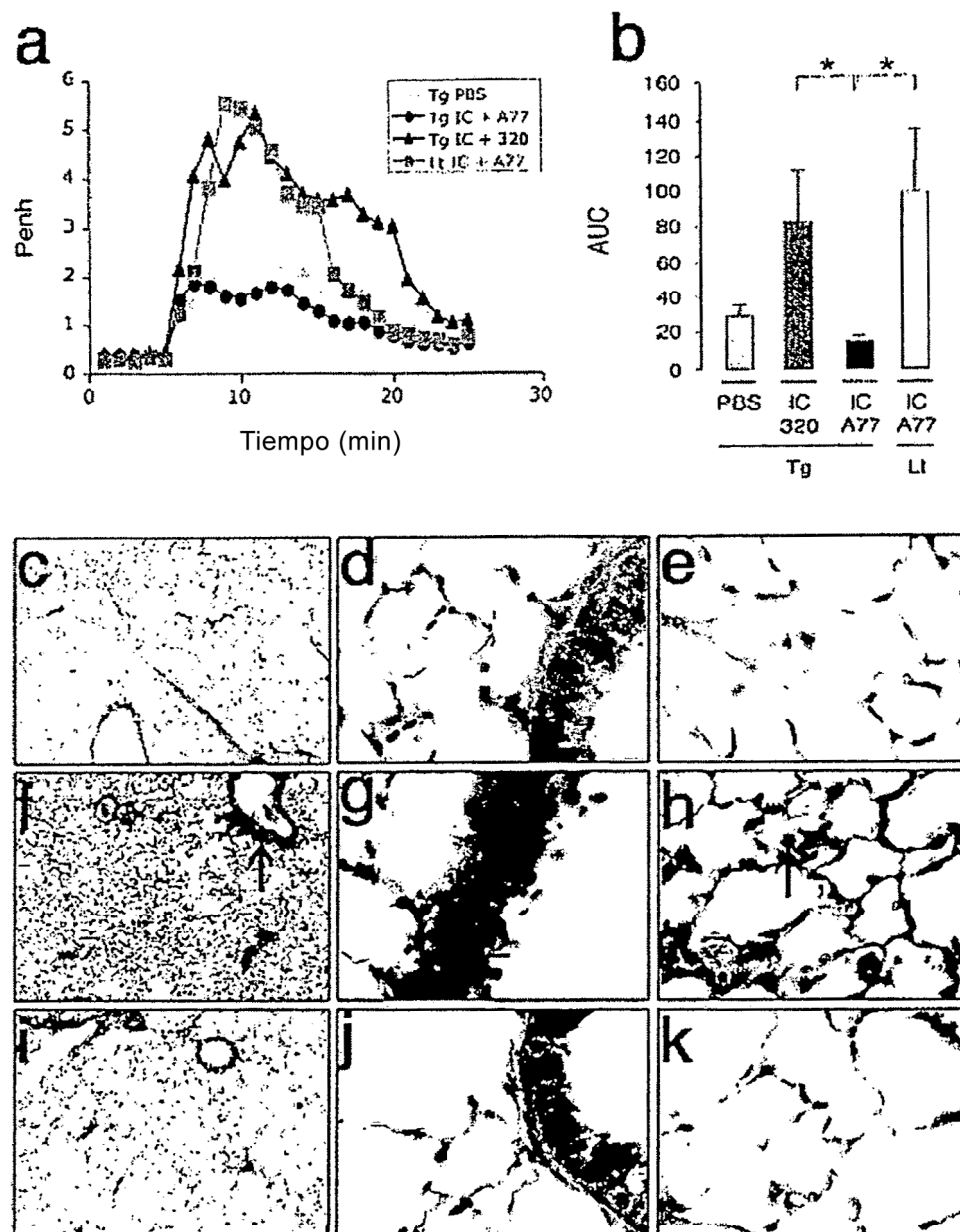


FIG. 7

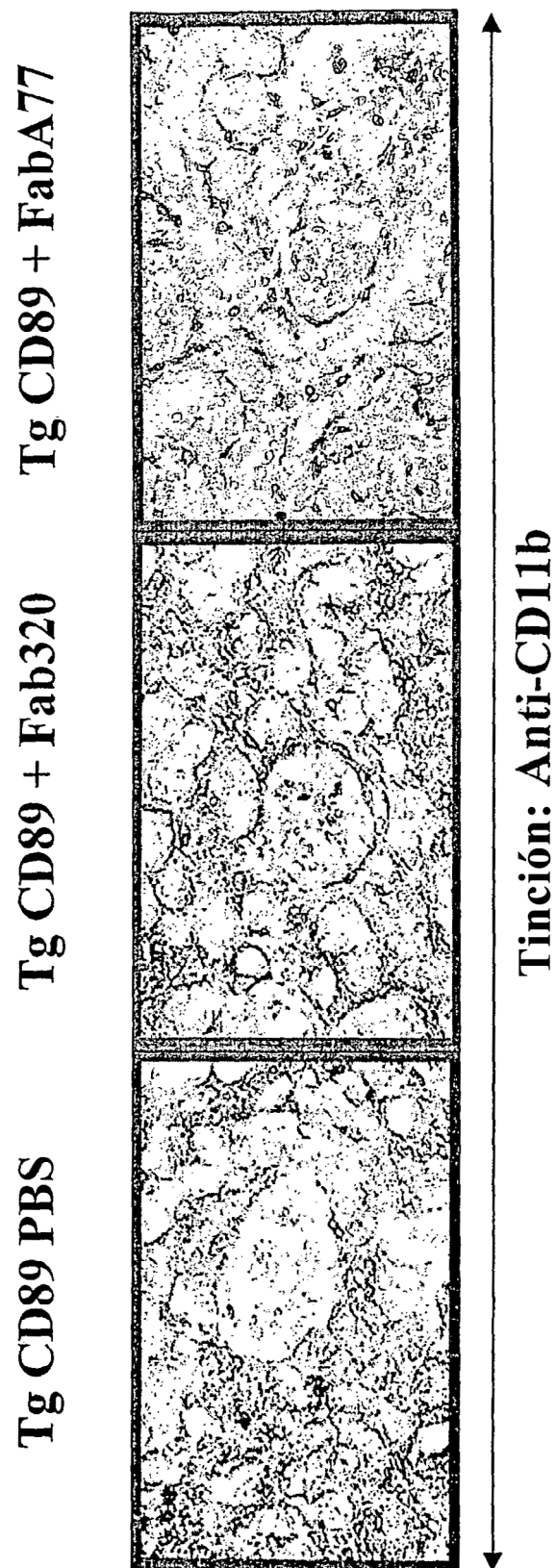


FIG. 8