

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 481**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05718931 .8**
96 Fecha de presentación: **30.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1730194**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54 Título: **ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS PARA ELEGIR COMO DIANA CÉLULAS QUE PARTICIPAN EN REACCIONES DE TIPO ALÉRGICO, COMPOSICIONES Y USOS DE LOS MISMOS.**

30 Prioridad:
30.03.2004 US 557377 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2012

73 Titular/es:
**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
HI TECH PARK, EDMOND SAFRA CAMPUS
GIVAT RAM P.O. BOX 39135
91390 JERUSALEM, IL y
DIMES-DIPARTIMENTO DO MEDICINA
SPERIMENTALE**

72 Inventor/es:
**LEVI-SCHAFFER, Francesca;
BACHELET, Ido;
MUNITZ, Ariel;
MORETTA, Lorenzo y
MORETTA, Alessandro**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 481 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

Anticuerpos biespecíficos para elegir como diana células que participan en reacciones de tipo alérgico, composiciones y usos de los mismos

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico o a cualquier fragmento de unión del mismo según la reivindicación 1, a una composición farmacéutica según la reivindicación 12, al uso de al menos uno de los anticuerpos biespecíficos según la reivindicación 14.

La presente invención se refiere al campo de la inmunofarmacología. Más específicamente, la presente invención se refiere a una molécula biespecífica que hace de modulador de inflamación alérgica, siendo una herramienta tanto preventiva como terapéutica.

10 **Antecedentes de la invención**

OTT V.L. y col. se refiere a "Activating and inhibitory signaling in mast cells: new opportunities for therapeutic intervention", Journal of allergy and clinical immunology, Mosby, libro anual, Inc, US, vol. 106, nº 3. Septiembre de 2000, páginas 429-440.

15 El documento WO 03/064662 A desvela moléculas biespecíficas que pueden reticular receptores de ITAM y ITIM sobre una célula con el fin de inhibir la activación de la célula, además de enfoques de terapia génica usando nucleótidos que codifican tales moléculas biespecíficas para la expresión *in vivo*. Un ejemplo de un par de receptores ITAM/ITIM es Fc epsilon RI y HM18, y otro es Fc epsilon RI y Fc gamma RII. La reticulación de estos receptores con una molécula biespecífica conduciría a la inhibición de la liberación de mediadores alérgicos y a la mejora de los síntomas de enfermedades alérgicas. Otras enfermedades pueden mejorarse por reticulación de pares de receptores ITIM/ITAM.

20 **A. Inflamación alérgica**

La inflamación alérgica es un fenómeno complejo que implica diversos tipos de células tales como células inflamatorias y estructurales. Los mastocitos son los iniciadores bien establecidos de inflamación alérgica, atracción, activación y finalmente interacción con otras células inflamatorias, principalmente los eosinófilos. La inflamación alérgica comprende una variedad de patologías tales como asma, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, eczema atópico, etc. Entre estas enfermedades, y como un ejemplo, el asma es la enfermedad más común de la primera infancia, representando hasta el 20% en países occidentales y aumentando actualmente [Busse WW, Lemanske RF Jr. (2001) N Engl J Med. 344:3501].

30 La experimentación en el campo de la alergia ha proporcionado percepciones de mecanismos celulares y moleculares subyacentes a estas patologías. Estas investigaciones han conducido al entendimiento de que la respuesta alérgica es frecuentemente bifásica. La primera fase temprana se inicia por la activación de mastocitos (véase más adelante), mientras que la segunda fase tardía se provoca por la infiltración de células inflamatorias, predominantemente linfocitos T, eosinófilos y algunos basófilos [Broide DH, Firestein GS. (1991) J Clin Invest. 88:10482]. Sin embargo, el conocimiento todavía no ha proporcionado medios terapéuticos eficaces. Los enfoques actualmente usados ofrecen tanto alivio sintomático (es decir, antihistamínicos y antileucotrienos) como un tratamiento antiinflamatorio no selectivo (es decir, glucocorticosteroides). Además, los tratamientos inmunofarmacológicos recientemente desarrollados que eligen como diana un único anticuerpo (por ejemplo, IgE), citocina de linfocitos T (por ejemplo, anti-IL-5) o varios factores de transcripción (por ejemplo, STAT-6, GATA-3 o FOG-1) todavía no han demostrado ser eficaces.

40 **B. Mastocitos**

Los mastocitos son la morada de tejido, células que llevan FcεRI que contienen gránulos citoplásmicos importantes. Además de tener una función fundamental en las reacciones alérgicas, también participan en fibrosis, tumores, enfermedades autoinmunitarias e inmunidad innata. Los mastocitos están ampliamente distribuidos por todo el cuerpo, en tejidos conjuntivos y sobre las superficies de la mucosa en la que normalmente se localizan en estrecha proximidad a los vasos sanguíneos y los nervios periféricos. Por tanto, se exponen a estímulos medioambientales tales como microorganismos y alérgenos con los que pueden reaccionar, tanto dentro de minutos como durante un periodo de horas, y experimentar la secreción regulada de mediadores previamente formados y recientemente sintetizados.

50 Tras la activación, los mastocitos liberan una variedad de mediadores inflamatorios que incluyen constituyentes de gránulos previamente formados (por ejemplo, histamina, proteoglicanos y proteasas), PGD2, LTC4, PAF y, a un menor grado, LTB4, y una variedad de citocinas (por ejemplo IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, RANTES, IFN-γ, TGF-β, TNF-α, y GM-CSF) [Puxeddu I. y col. (2003) Int J Biochem Cell Biol. 35:16013].

55 Además de la activación de mastocitos clásica dependiente de IgE "alérgica" que es desencadenada por la unión de alérgenos a dos moléculas de IgE adyacentes unidas a FcεRI, hay otras formas de estimulación de mastocitos. La activación de mastocitos independiente de IgE puede ser particularmente importante en el marco de la fase tardía y

en inflamación crónica. Notablemente, aunque la terapia con anti-IgE se ha aprobado ahora para el tratamiento de asma, sólo induce una modesta mejora. Esto pone de relieve la participación de rutas dependientes de no IgE en el desarrollo de asma, además de la necesidad de nuevas dianas para intervención terapéutica. De hecho, el trabajo hecho en el laboratorio de los inventores (además de en otros) ha mostrado que numerosos mediadores pueden activar mastocitos [Piliponsky A.M. y col. (2003) *Blood* 101:1898-4; Feldweg, A. M. y col. (2003) *Eur. J. Immunol.* 33:2262-8]. Entre ellos, el factor de citoblasto (SCF), que es fundamentalmente responsable de la diferenciación, supervivencia, proliferación, maduración, quimiotaxia, adhesión, además de la activación, de mastocitos y el factor de crecimiento nervioso (NGF) que también induce activación de mastocitos.

La estimulación de mastocitos independiente de IgE también puede desencadenarse por compuestos polibásicos que comparten características estructurales similares esenciales para su actividad tales como el compuesto 48/80, neuropéptidos (VIP, CGRP, sustancia P, neurotensina) y proteína básica mayor (MBP) derivada de eosinófilos [Piliponsky A.M. y col. (2003) *id ibid*].

Los eosinófilos son granulocitos derivados de la médula ósea que se diferencian bajo la regulación de los factores de transcripción GATA-1 y 2 y c/EBP, y las citocinas IL-3, GM-CSF y IL-5 ("citocinas de supervivencia de eosinófilos") [Kaatz Maa y col. (2004) *Int. J. Mol. Med.* 14:1055-160]. Notablemente, las células CD4+ Th2 son los principales productores de estas citocinas [Umland SP y col. (1998) *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:631-42]. Los eosinófilos entran normalmente en la sangre y migran en el tracto gastrointestinal, pero en estados inflamatorios pueden acumularse en diversos tejidos. Aquí pueden sobrevivir durante varios días debido a efectos de las "citocinas de supervivencia" localmente liberadas antes de que se produzca la muerte celular programada. Los eosinófilos están asociados a mecanismos de defensa del huésped en infestaciones parasitarias y participan en la patogénesis de trastornos alérgicos, inmunológicos y malignos, además de en una variedad de síndromes hipereosinofílicos idiopáticos [Bain, B.J. (2004) *Am J Hematol* 77:82-5; Klion, A.D. y col. (2004) *J. Allergy Clin. Immunol.* 113:30-7]. En LAR (respuesta asmática tardía), los eosinófilos pueden ser responsables de la lesión a tejido (principalmente epitelial) mediante la liberación de sus proteínas granulares citotóxicas. Además, la prueba es la emergencia de eosinófilos de implicación como células efectoras que participan en la reparación de tejido y la fibrosis asociada a asma [Levi-Schaffer, F. y col. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9660-5].

Los eosinófilos almacenan mediadores de gránulos previamente formados, como la proteína básica mayor (MBP), proteína catiónica de eosinófilos (ECP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) y peroxidasa de eosinófilos (EPO); sintetizan mediadores de lípidos como PAF, LTC4 y PGE2, además de citocinas y quimiocinas proinflamatorias e inmunorreguladoras como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, GM-CSF, SCF, NGF, TNF- α , TGF- β , INF- γ , MIP-1, RANTES y eotaxina [Piliponsky, A.M. y col. (2002) *Mol Immunol* 38:1369]. Se encontró que las proteínas básicas de eosinófilos eran altamente tóxicas *in vitro* para las células epiteliales respiratorias a concentraciones detectadas en líquido biológico de pacientes con asma. Además, los eosinófilos producen metaloproteínasa de la matriz (MMP)-9 y metaloproteínasa de la matriz inhibidora de tejido (TIMP)-1/2. Estas células también contienen heparanasa y son una fuente para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de b-fibroblastos (b-FGF) [Munitz, A. y col. (2004) *Allergy* 59:268-75], que indica claramente su función en fibrosis asociada a asma y fibrosis con asma.

La activación de eosinófilos y la consiguiente liberación de mediadores, tanto en el entorno alérgico como en otras enfermedades, pueden inducirse por una serie de agonistas. En realidad, los receptores para varios mediadores proinflamatorios (es decir, C5a, PAF), citocinas (es decir, IL-5, GM-CSF, IL-3, IL-2, IFN, etc.), inmunoglobulinas (es decir, IgG, IgA) y quimiocinas (es decir, CCR3) [Munitz (2004) *id ibid.*] se expresan sobre la superficie de eosinófilos. Sin embargo, no se conoce la función de estos receptores en la promoción de la activación de eosinófilos *in vivo* (especialmente en el entorno de inflamación alérgica crónica de las vías respiratorias). Esto no es precisamente una cuestión académica, ya que el bloqueo de la activación de eosinófilos está siendo actualmente demandado para el tratamiento de asma. Resultados recientes con terapia con anti-IL-5 han reafirmado la necesidad de identificar los mecanismos fundamentales de activación de eosinófilos, ya que este reactivo no tuvo un impacto significativo sobre la desgranulación de eosinófilos en asmáticos [Kay, A.B. y col. (2003) *Am J Respir Crit Care Med* 167:1586-7]. También se ha encontrado que los eosinófilos expresan varios receptores de la superficie celular de la superfamilia de las Ig inhibidoras/activadoras adicionales también expresados en mastocitos tales como LIR-3/ILT-5, LIR-1/ILT-2, LIR-2/ILT-4, LIR-7/ILT-1 [Tedla N. y col. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1174-9] y siglecs [Nutku, E. y col. (2003) *Blood* 101:5014-20].

Los eosinófilos se encuentran con los mastocitos en el tejido durante la fase tardía del proceso inflamatorio alérgico. Recientemente han aparecido pruebas que indican que hay una interferencia importante entre estas dos células. El trabajo hecho en el laboratorio de los inventores ha mostrado que la supervivencia de eosinófilos es potenciada por TNF- α derivado de mastocitos mediante TNF- α RI y TNF- α RII [Temkin, V. y col. (2001) *Cytokine* 15:20-6]. Además, la triptasa derivada de mastocitos previamente formada induce la producción y liberación de IL-6 y IL-8 y de eosinófilos de sangre periférica humana por PAR-II iniciando la ruta de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK)/AP-1, mientras que el GM-CSF producido por los mastocitos activados por IgE induce supervivencia de eosinófilos y liberación de proteína catiónica de eosinófilos (ECP). Los mastocitos derivados de pulmón humano son responsables de MBP cuando se co-cultivan con fibroblastos mediante un procedimiento dependiente del SCF unido a membrana. Notablemente, los eosinófilos también sintetizan SCF y NGF. En conjunto, todo esto fortalece la importancia de los mastocitos y eosinófilos en las fases tardía y crónica de inflamación alérgica [Temkin V. y col.

(2002) J Immunol. 169:2662; Hartman M. y col. (2001) Blood 97:10865-6; Solomon, A. y col. (1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102:454-60].

5 Recientemente se ha hecho evidente que la desgranulación de mastocitos está regulada por receptores activadores e inhibidores de la superficie adicionales tales como FcγRIIB, gp49A/B1B2, PIR-B, LIR/ILT y lectinas similares a Ig de unión a ácido siálico (siglecs) que se expresan sobre mastocitos y son funcionales sobre mastocitos murinos y humanos [Katz HR. (2002) Curr Opin Immunol. 14:6987].

C. Receptores inhibidores

10 Cada vez es más evidente que tanto los mastocitos como los eosinófilos expresan varios receptores inhibidores que pertenecen tanto a la superfamilia de los receptores de Ig (caracterizados por un único dominio similar a Ig de tipo V en la porción extracelular tal como KIR, LIR/ILT, LAIR, gp49B1, etc.) como a la superfamilia de las lectinas de tipo c (dependientes del calcio) (tales como MAFA, CD94/NKG2A). Esta gran familia de receptores inhibidores inmunitarios puede identificarse por una secuencia de aminoácidos consenso, el motivo inhibitor del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM). El ITIM está presente en el dominio citoplásmico de estas moléculas. La secuencia del arquetipo de
15 ITIM está compuesta por 6 aminoácidos (Ile/Val/Leu/Ser)-X-Tyr-X-X-(Leu/Val) en la que X denota cualquier aminoácido. Tras la activación, estos receptores inhibidores se someten a fosforilación de tirosina, frecuentemente por una cinasa de la familia Src, que proporciona un sitio de acoplamiento para el reclutamiento de fosfatasa citoplásmicas que tienen un dominio de homología 2 de Src (SH2) tal como SHP-1, -2 y SHIP-1, -2 [Ravetch JV, Lanier LL. (2000) Science. 290:848].

20 Como se ha descrito previamente, los mastocitos pueden activarse por estímulos dependientes (mediados por FcsRI) o independientes de IgE. La activación de mastocitos mediante los mecanismos dependientes de IgE produce el rápido reclutamiento de syk y lyn por los residuos fosforilados con tirosina en el componente intracelular del receptor de FcsRI llamado ITAM (motivo activador del inmunorreceptor basado en tirosina). La consecuencia de esta acción es la liberación y síntesis de histamina y otros mediadores previamente formados, y la liberación de mediadores de lípidos por un procedimiento rápido que se completa en menos de 30 minutos. Además, el SCF y el
25 NGF, que activan mastocitos, dependen de las cinasas de la familia Src. De forma interesante, tanto los estímulos dependientes como independientes de IgE son regulados por receptores inhibidores al menos *in vivo* en modelos de ratones. Por tanto, el reclutamiento de SHP-1, -2 y SHIP-1, -2 que desfosforilan dominios de ITAM o actividad de cinasa producen la regulación por disminución de la activación de mastocitos. Esta inhibición se ha descrito meticulosamente para el receptor inhibitor de gp49B1 sobre mastocitos murinos, en el que la co-ligación del
30 receptor inhibitor con FcεRI produjo la inhibición del mediador de gránulos secretores (histamina, β-hexosaminidasa) y la liberación de LTC4 [Katz H.R. y col. (1996) Proc Natl Acad Sci USA. 93:10809].

35 IRp60 (proteína 60 del receptor inhibitor) es un receptor inhibitor que pertenece a la superfamilia de las Ig. Se expresa en muchos tipos de células tales como linfocitos T, células NK y granulocitos. La reticulación de IRp60 sobre células NK produce la regulación por disminución de la actividad citolítica de NK. Además, el tratamiento de IRp60 con pervanadato de sodio condujo a la fosforilación de tirosina de IRp60 marcada y a la asociación con tanto SHP-1 como SHP-2 [Cantoni C. y col. (1999) Eur J Immunol. 29:3148]. Además, la reticulación de IRp60 inhibió la actividad citolítica de clones de linfocitos T en ensayos de destrucción redirigida usando mAb anti-CD3. Y, lo que es más importante, el ligando de IRp60 es todavía desconocido.

D. Anticuerpos biespecíficos (BsAb).

40 En los últimos años, la terapia con anticuerpos se ha convertido en una nueva modalidad de tratamiento para una inmensa matriz de enfermedades tales como cáncer, malaria y asma. Sin embargo, es ampliamente aceptado que la eficacia de anticuerpos requiere más mejora. Los anticuerpos biespecíficos son proteínas que tienen dos especificidades de unión diferentes, normalmente diseñados para reconocer dos antígenos diferentes sobre diferentes células. Por tanto, un sitio de unión es específico para un antígeno sobre la célula diana (es decir, célula infectada o cancerosa), mientras que el otro sitio de unión reconoce específicamente un antígeno sobre la célula
45 efectora inmunitaria. Por consiguiente, los mecanismos de células efectoras serán ejercidos sobre la célula diana conduciendo a una respuesta inmunitaria apropiada [Hudson, P.J. y col. (2003) Nat. Med. 9:129-34].

50 Los anticuerpos biespecíficos de primera generación se produjeron fusionando dos líneas celulares de hibridoma establecidas para formar cuadromas [Milstein C, Cuello AC. (1983) Nature. 305:537] o por reticulación química de fragmentos F(ab') respectivos [Karpovsky B. y col. (1984) J Exp Med. 160:1686]. Los estudios *in vitro*, *in vivo* y clínicos hechos con tales anticuerpos biespecíficos confirmaron el potencial terapéutico de un tratamiento tal [van de Winkel J.G. y col. (1997) Immunol Today. 18:562].

55 Un enfoque novedoso con anticuerpos biespecíficos ha sido tener los dos antígenos diferentes que van a reconocerse presentes en la misma célula. Daeron y col. [documento US 2004/0038894] describen la posibilidad de que un anticuerpo biespecífico que reconocería receptores de inmunoglobulina de células asesinas KIR inhibitoras que se expresan principalmente en células NK y actúan de receptores de la superficie celular para las moléculas de la clase I del MHC - y simultáneamente un receptor estimulante, por ejemplo, receptores que llevan ITAM tales como un receptor de Ig activante, FcεRI, CD3/TCR, sólo por citar algunos, tuviera la capacidad de reticular dicho receptor

- 5 estimulante con dicho KIR, intra- o extra-celularmente. Entonces, dicha reticulación produciría la regulación de la activación de dicho receptor estimulante, para el que el resultado final sería la modulación de respuestas inmunitarias e inflamatorias. Esta predicción se confirma en realidad por Tam y col. [Tam, S.W. y col. (2004) Allergy 59(7):772], que describieron la generación de un anticuerpo biespecífico contra IgE humana y FcγRII humano. Dicho anticuerpo pudo inhibir la liberación de histamina inducida por antígeno por mastocitos y basófilos humanos.
- Los presentes inventores han caracterizado la expresión de receptores inhibidores en mastocitos y eosinófilos, y particularmente la expresión de la IRp60 del receptor inhibidor en estas células (véanse los ejemplos más adelante).
- 10 En la presente invención, los inventores describen la generación de anticuerpos biespecíficos que pueden unirse y activar la IRp60 del receptor inhibidor en un modo específico para célula debido a su módulo específico para célula diana.
- El enfoque particular del presente estudio es elegir como diana células que participan en la respuesta alérgica como mastocitos, eosinófilos y basófilos y, por tanto, proporcionar un nuevo agente específico para células más eficiente para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la alergia.
- 15 Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un BsAb que reconoce y activa la IRp60 del receptor inhibidor (primer componente del BsAb) y otro marcador (segundo componente del BsAb) específico para mastocitos, eosinófilos o basófilos, siendo dicho marcador un activador (o un receptor) cuya ruta de transducción de señales se inhibe por la activación del receptor inhibidor (es decir, el primer componente del BsAb).
- 20 El anticuerpo biespecífico o cualquier fragmento de unión del mismo de la presente invención se define en la reivindicación 1, la composición farmacéutica de la presente invención se define en la reivindicación 12, el uso de al menos uno de los anticuerpos biespecíficos de la presente invención se define en la reivindicación 14.
- 25 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un complejo biespecífico que elige como diana una célula diana, en el que dicho complejo comprende dos componentes de reconocimiento diana diferentes, comprendiendo cada uno de dichos componentes una molécula que se une específicamente a una primera y segunda dianas localizadas sobre dicha célula diana, respectivamente, o cualquier fragmento funcional de la misma, en el que una diana es la TRp60 del receptor inhibidor u homólogos de la misma, y la segunda diana es un activador específico para células que activa la ruta inhibidora mediada por dicho receptor inhibidor. Y, lo que es más importante, la unión de dicho complejo a dicha célula diana inhibe reacciones de tipo alérgico.
- 30 En una realización, dichos componentes de reconocimiento diana están ligados mediante uno cualquiera de un reticulador, un compuesto ligador, un vehículo, un espaciador sintético, un sustrato de inmovilización y un motivo (Gly₄Ser)₃ basado en la región flexible. Preferentemente, dichos componentes de reconocimiento diana están reticulados.
- En otra realización, dicha célula se deriva del linaje hematopoyético, y es preferentemente una de un mastocito, un eosinófilo y un basófilo.
- 35 En otra realización, la segunda diana de dicho complejo biespecífico puede seleccionarse del grupo que consiste en inmunoglobulinas, receptores de Fc, receptores de citocinas, receptores de factores de crecimiento, moléculas de adhesión, receptores de la superfamilia de las Ig, receptores de quimiocinas, receptor de mediadores inflamatorios, receptores de hormonas, receptores de factores del complemento, receptores activados por proteasa y enzimas.
- 40 El componente de reconocimiento del complejo biespecífico puede seleccionarse de uno cualquiera de un anticuerpo que se produce naturalmente, sintético o recombinante, Fv monocatenario (scFv), scFv bifuncional, diacuerpo, unidad F(ab), unidad F(ab'), conjugado biespecífico de F(ab'), anticuerpo bifuncional químicamente reticulado, anticuerpo lineal, fragmento de unión a antígeno F(ab')₂ de un anticuerpo, o cualquier fragmento funcional del mismo. Preferentemente, el componente de reconocimiento es un conjugado biespecífico de F(ab'), es decir, dos unidades F(ab') ligadas juntas.
- 45 En una realización particular, dicha célula diana del complejo biespecífico es un mastocito, y dicha segunda diana es una de IgE, cKIT y FcεRI.
- En una realización específica, la invención proporciona un complejo biespecífico para elegir como diana una célula diana, en el que dicho complejo comprende un conjugado biespecífico de F(ab'), IRp60 de reconocimiento o cualquier homólogo de la misma, y IgE.
- 50 En esta realización específica, las unidades F(ab') se corresponden con fragmentos F(ab') de dos anticuerpos diferentes, uno contra IRp60 y uno contra IgE.
- En otra realización específica, la invención proporciona un complejo biespecífico para elegir como diana una célula diana, en el que dicho complejo comprende un conjugado biespecífico de F(ab'), IRp60 de reconocimiento o cualquier homólogo de la misma, y cKIT.

En otra realización específica, la invención proporciona un complejo biespecífico para elegir como diana una célula diana, en el que dicho complejo comprende un conjugado biespecífico de F(ab'), IRp60 de reconocimiento o cualquier homólogo de la misma, y FcεRI.

5 Uno cualquiera de los complejos biespecíficos anteriormente mencionados puede actuar de inhibidor de la actividad de mastocitos.

En otra realización particular, dicha célula diana es un eosinófilo, y dicha segunda diana es una de receptor de IL-5 (IL-5R) y el receptor para eotaxina (CCR3). Por tanto, el complejo biespecífico de la invención puede ser un complejo que comprende un conjugado biespecífico de F(ab'), IRp60 de reconocimiento o cualquier homólogo de la misma, y IL-5R o CCR3. Dicho complejo puede actuar de inhibidor de la actividad de eosinófilos.

10 Los complejos biespecíficos descritos en la presente invención pueden actuar de inhibidores de la actividad de células efectoras de alergia, y son especialmente adecuados para tratar afecciones inducidas por una de reacciones alérgicas y reacciones mediadas por mastocitos y/o eosinófilos y/o basófilos. Dichas afecciones se seleccionan del grupo que consiste en: asma alérgico, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica estacional, dermatitis atópica y eczema atópico, trastornos alérgicos y respuestas a diversos alérgenos, anafilaxia sistémica, mastocitosis sistémica, morfea/urticaria pigmentosa, leucemia de mastocitos, aterosclerosis, rechazo de injerto, esclerosis múltiple, enfermedades pulmonares fibróticas, neurofibromatosis, queloides, esclerodermia, artritis reumatoide, osteoartritis, gota aguda, penfigoide cicatricial ocular, enfermedad de Crohn, adhesiones peritoneales, enfermedad crónica de injerto frente a huésped (cGVHD), síndrome de eosinofilia-mialgia, asma bronquial extrínseco, poliposis nasal, granulomatosis de Wegener, asma bronquial intrínseco, enfermedades pulmonares intersticiales y otras enfermedades pulmonares, neumonía eosinofílica crónica, neumonitis por hipersensibilidad, aspergilosis broncopulmonar alérgica, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática; enfermedades neoplásicas y mieloproliferativas, linfomas de linfocitos T y enfermedad de Hodgkin.

25 Los complejos biespecíficos en los que la segunda diana de reconocimiento es IgE, cKIT o FcεRI son especialmente adecuados para su uso como agentes en el tratamiento de afecciones asociadas a mastocitos, en las que dichas afecciones son particularmente asma alérgico, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica estacional, dermatitis atópica y eczema atópico, trastornos alérgicos y respuestas a diversos alérgenos, anafilaxia sistémica, mastocitosis sistémica, morfea/urticaria pigmentosa, leucemia de mastocitos, aterosclerosis, rechazo de injerto, esclerosis múltiple, enfermedades pulmonares fibróticas, neurofibromatosis, queloides, esclerodermia, artritis reumatoide, osteoartritis, gota aguda, penfigoide cicatricial ocular, enfermedad de Crohn, adhesiones peritoneales, enfermedad crónica de injerto frente a huésped (GVHD).

30 Los complejos biespecíficos en los que la segunda diana de reconocimiento es IL-5R o CCR3 son especialmente adecuados para su uso como agentes en el tratamiento de afecciones asociadas a eosinófilos, en las que dichas afecciones son particularmente asma bronquial extrínseco, rinitis alérgica, dermatitis oncocerquiiana, dermatitis atópica, poliposis nasal, nódulos, eosinofilia, reumatismo, dermatitis e hinchazón (NERDS), enfermedades granulomatosas vasculíticas, vasculitis temporal, síndrome de Churg-Strauss, poliarteritis, granulomatosis de Wegener, esclerosis múltiple, rechazo de injerto, asma bronquial intrínseco, enfermedades pulmonares intersticiales y otras enfermedades pulmonares, efusiones pleurales eosinofílicas, infiltrados eosinofílicos pulmonares transitorios (Löffler), histiocitosis, neumonía eosinofílica crónica, neumonitis por hipersensibilidad, aspergilosis broncopulmonar alérgica, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, eosinofilia tópica, enfermedad del arañazo de gato, tuberculosis afebril, neumonía por clamidia en la infancia, enfermedades neoplásicas y mieloproliferativas, carcinoma broncogénico, síndrome hipereosinofílico, linfomas de linfocitos T y enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Crohn, queratoconjuntivitis primaveral, nevo por conjuntivitis inflamada juvenil, enfermedad de Kimura, enfermedad de Gleich.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende como agente activo un complejo biespecífico como se describe en este documento. Dicha composición farmacéutica puede ser para uso médico.

50 En una realización, dicha composición farmacéutica comprende como agente activo un complejo biespecífico en el que la segunda diana de reconocimiento es una de IgE, cKIT y FcεRI y es especialmente adecuada para su uso en el tratamiento de cualquier enfermedad o afección derivada de hiperactividad o hiperplasia por mastocitos. Dichas enfermedades se seleccionan del grupo que consiste en: asma alérgico, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica y eczema atópico, trastornos alérgicos y respuestas a diversos alérgenos, anafilaxia sistémica, mastocitosis sistémica, morfea/urticaria pigmentosa, leucemia de mastocitos, aterosclerosis, rechazo de injerto, esclerosis múltiple, enfermedades pulmonares fibróticas, neurofibromatosis, queloides, esclerodermia, artritis reumatoide, osteoartritis, gota aguda, penfigoide cicatricial ocular, enfermedad de Crohn, adhesiones peritoneales, GVHD crónica, asma bronquial, poliposis nasal, granulomatosis de Wegener, enfermedades pulmonares intersticiales y otras enfermedades pulmonares, neumonía eosinofílica crónica, neumonitis por hipersensibilidad, aspergilosis broncopulmonar alérgica, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedades neoplásicas y mieloproliferativas, linfomas de linfocitos T y enfermedad de Hodgkin.

En otra realización, dicha composición farmacéutica comprende como agente activo un complejo biespecífico en la

que la segunda diana de reconocimiento es IL-5R o CCR3, y es especialmente adecuada para su uso en el tratamiento de cualquier enfermedad o afección derivada de hiperactividad o hiperplasia por eosinófilos. Dichas afecciones se seleccionan del grupo que consiste en asma bronquial extrínseco, rinitis alérgica, dermatitis oncocerquiiana, dermatitis atópica, poliposis nasal, nódulos, eosinofilia, reumatismo, dermatitis e hinchazón (NERDS), enfermedades granulomatosas vasculíticas, vasculitis temporal, síndrome de Churg-Strauss, poliarteritis, granulomatosis de Wegener, esclerosis múltiple, rechazo de injerto, asma bronquial, enfermedades pulmonares intersticiales y otras enfermedades pulmonares, efusiones pleurales eosinofílicas, infiltrados eosinofílicos pulmonares transitorios (Löfller), histiocitosis, neumonía eosinofílica crónica, neumonitis por hipersensibilidad, aspergilosis broncopulmonar alérgica, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, eosinofilia tóxica, enfermedad del araño de gato, tuberculosis afebril, neumonía por clamidia en la infancia, enfermedades neoplásicas y mieloproliferativas, carcinoma broncogénico, síndrome hipereosinofílico, linfomas de linfocitos T y enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Crohn, queratoconjuntivitis nerviosa primaveral, enfermedad de Kimura, enfermedad de Gleich.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender adicionalmente tampones, aditivos, estabilizadores, diluyentes y/o excipientes, y también puede designarse una formulación farmacéutica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del complejo biespecífico descrito en la invención en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cualquier enfermedad o afección asociada a una hiperactividad o hiperplasia por mastocitos y/o eosinófilos, en el que dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: asma alérgico, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica y eczema atópico, trastornos alérgicos y respuestas a diversos alergenos, anafilaxia sistémica, mastocitosis sistémica, morfea/urticaria pigmentosa, leucemia de mastocitos, aterosclerosis, rechazo de injerto, esclerosis múltiple, enfermedades pulmonares fibróticas, neurofibromatosis, queloides, esclerodermia, artritis reumatoide, osteoartritis, gota aguda, penfigoide cicatricial ocular, enfermedad de Crohn, adhesiones peritoneales, enfermedad crónica de injerto frente a huésped (GVHD), síndrome de eosinofilia-mialgia, asma bronquial, poliposis nasal, granulomatosis de Wegener, enfermedades pulmonares intersticiales y otras enfermedades pulmonares, neumonía eosinofílica crónica, neumonitis por hipersensibilidad, aspergilosis broncopulmonar alérgica, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedades neoplásicas y mieloproliferativas, linfomas de linfocitos T y enfermedad de Hodgkin.

Una realización particular de este aspecto de la invención es el uso del complejo biespecífico en el que la segunda diana de reconocimiento es IgE, cKIT o FcεRI, o una composición farmacéutica que comprende los mismos, en la inhibición de la función de mastocitos.

Otra realización particular de este aspecto de la presente invención es el uso del complejo biespecífico en el que la segunda diana de reconocimiento es IL-5R o CCR3, o una composición farmacéutica que comprende los mismos, en la inhibición de la función de eosinófilos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de cualquier enfermedad o afección asociada a hiperactividad y hiperplasia por mastocitos que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del complejo biespecífico de la invención en el que la segunda diana de reconocimiento es IgE, cKIT o FcεRI, o una composición que comprende los mismos, a un sujeto en necesidad.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de cualquier enfermedad o afección derivada de hiperactividad e hiperplasia por eosinófilos que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del complejo biespecífico de la invención en el que la segunda diana de reconocimiento es IL-5R o CCR3, o una composición que comprende los mismos, a un sujeto en necesidad.

Además, la presente invención también proporciona un procedimiento para inhibir la actividad de mastocitos que comprende poner en contacto mastocitos con el complejo biespecífico del complejo biespecífico de la invención en el que la segunda diana de reconocimiento es IgE, cKIT o FcεRI, o una composición que comprende los mismos, durante una cantidad de tiempo adecuada.

Alternativamente se proporciona un procedimiento para inhibir actividad de eosinófilos que comprende poner en contacto eosinófilos con el complejo biespecífico de la invención en el que la segunda diana de reconocimiento es IL-5R o CCR3, o con una composición que comprende los mismos, durante una cantidad de tiempo adecuada.

La invención se describirá en más detalle mediante las siguientes figuras.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Cribado de mastocitos humanos para receptores de NK inhibidores. El análisis de FACS de un gran panel de receptores con función inhibidora conocida sobre células NK reveló que los mastocitos humanos expresan IRp60 en altos niveles. Esta expresión es única ya que los otros receptores inhibidores no se expresaron [n=4].

Figura 2A-2B: IRp60 se expresa en mastocitos y en eosinófilos.

Fig. 2A: Mastocitos humanos expresan IRp60. Análisis de FACS de la expresión de IRp60 sobre CBMC y HLMC. IRp60 se detectó en CBMC [izquierda] y HLMC [derecha] usando un anticuerpo anti-IRp60 monoclonal seguido de anti-FITC de ratón. Los picos negros representan controles de isotipo negativo. Los picos blancos representan tinción con anti-IRp60. Representativo de n=10 [CBMC] y n=3 [HLMC].

5 Fig. 2B: La expresión de IRp60 es modulada por la proteína básica mayor (MBP) de eosinófilos. Se incubaron CBMC con MBP derivada de eosinófilos [izquierda] o poli-L-arginina [derecha] durante 24 horas y la expresión de IRp60 se analizó por FACS. Los picos negros [iso] representan controles de isotipo negativo usando IgG. Los picos grises [EM] representan tinción con anti-IRp60 de CBMC tratadas con medio enriquecido solo. Los picos blancos representan tinción con anti-IRp60 de tanto CBMC tratadas con MBP [izquierda] como tratadas con poli-L-arginina [derecha].

Figura 3A-3B: La reticulación de IRp60 inhibe la liberación mediada por IgE de

Fig. 3A: Liberación en porcentaje de β -hexosaminidasa y triptasa de CBMC activadas con IgE tras la estimulación con anti-IRp60.

Fig. 3B: Liberación en porcentaje de IL-4 de CBMC activadas con IgE tras la estimulación con anti-IRp60.

15 Se incubaron CBMC en placa recubierta con anti-IRp60 y se activaron con anticuerpo anti-IgE durante 30 min. Los niveles de liberación de β -hexosaminidasa y triptasa se evaluaron por ensayos cromogénicos enzimáticos como se describen, y se expresaron como la liberación en %. El nivel de liberación de IL-4 se evaluó por ELISA y se expresó en pg/ml. La liberación de β -hexosaminidasa se evaluó como se describe. EM, medio enriquecido solo; X, reticuladores [IgE de oveja anti-ratón, de cabra anti-ratón]; anti-IRp60, pocillo recubierto con anti-IRp60; IgG, pocillo recubierto con isotipo.

Figura 4: La reticulación de IRp60 inhibe la supervivencia de CBMC inducidas por SCF.

25 Se incubaron CBMC con o sin SCF [100 ng/ml] en una placa recubierta con anti-IRp60 durante 24 y 48 horas, se tiñeron para yoduro de propidio [PI] y las células positivas para PI se analizaron por FACS. Los datos se presentan como % de células positivas para PI en el total. EM, medio enriquecido solo; X, reticuladores [IgE de oveja anti-ratón, de cabra anti-ratón]; IRp60, pocillo recubierto con anti-IRp60; Iso, pocillo recubierto con isotipo.

Figura 5: La reticulación de IRp60 inhibe el flujo de entrada de $[Ca^{2+}]$ inducido por IgE.

30 IRp60 sobre CBMC se reticuló por incubación con anticuerpos anti-IRp60 y de oveja anti-ratón y las células se cargaron con Calcium Green-1AM. La $[Ca^{2+}]$ se representa por la media geométrica de FL-1. EM, medio enriquecido solo; X, reticuladores [IgE de oveja anti-ratón, de cabra anti-ratón]; IRp60, anti-IRp60; Iso, isotipo.

Figura 6A-6B: Fosforilación de tirosina por IRp60 y reclutamiento de fosfatasa.

Fig. 6A: Se trataron CBMC con ortovanadato de sodio. La IRp60 se precipitó usando anti-IRp60 o IgG1 [control negativo] y se transfirió frente a fosfotirosina [pY99], SHP-1,2 y SHIP-1.

35 Fig. 6B: La fosforilación de tirosina por IRp60 depende de la reticulación de receptores. Se incubaron CBMC en pocillos recubiertos con anti-IRp60/IgG1 durante 0, 15, 30, 60 y 120 s, o en placa recubierta con IgG durante 30 y 60 s, seguido de precipitación y transferencia Western frente a fosfotirosina [pY99] o IRp60 como control de la cantidad de proteína.

Figura 7: Los mastocitos de ratón expresan LMIR1.

40 Los mastocitos de la médula ósea y los mastocitos peritoneales recientemente aislados de ratones BALB/c se tiñeron con anticuerpo monoclonal y se analizaron por FACS. BMMC, mastocitos de la médula ósea; MPMC, mastocitos peritoneales.

Figura 8A-8D: La neutralización de LMIR1 conduce a una activación de mastocitos aumentada y a la consiguiente infiltración de eosinófilos en un modelo de ratón de peritonitis alérgica.

45 La peritonitis alérgica inducida por OVA se indujo como se describe, se sacrificaron 45 min o 48 h después de la exposición a OVA y la cavidad peritoneal se lavó para el análisis de mediadores y el recuento de células, y citometría de flujo, respectivamente. Los niveles de triptasa y β -hexosaminidasa se evaluaron usando ensayos cromogénicos enzimáticos como se describen. Las células del lavado recogidas 48 h tras la exposición se tiñeron para CCR3 y se analizaron por FACS.

50 Fig. 8A: La neutralización de LMIR1 condujo a un espectacular aumento en los niveles de triptasa peritoneal 45 min después de la exposición.

Fig. 8B: La neutralización de LMIR1 condujo a un espectacular aumento en los niveles de β -hexosaminidasa peritoneal 45 min después de la exposición.

Fig. 8C: Aumento del número de eosinófilos infiltrados en la cavidad peritoneal tras la neutralización de LMIR1 (24 h después de la exposición).

5 Fig. 8D: La neutralización de LMIR1 condujo a un aumento espectacular en los niveles de eotaxina-2 peritoneal 24 h después de la exposición.

Figura 9A-9B: El IRp60 se expresa en eosinófilos humanos.

10 Fig. 9A: Patrón de expresión de receptores inhibidores sobre mastocitos humanos. Análisis de FACS que muestra los niveles de expresión de IRp60, p140, LIR3/ILT5, Fc γ RIIB, LIR1/ILT2, LIR3/ILT5, p58.1, p58.2, p70 y NKG2A/CD94 (n=10) en CBMC.

Fig. 9B: Eosinófilos de pólipos nasales expresan niveles significativos de IRp60. El pico izquierdo se corresponde con el anticuerpo del mismo control de isotipo, mientras que el pico derecho muestra la tinción para IRp60.

Figura 10A-B: IRp60 inhibe la supervivencia mediada por GM-CSF de eosinófilos humanos.

15 Las gráficas muestran el porcentaje de eosinófilos apoptóticos después de la reticulación con anti-IRp60 o control del mismo isotipo y de oveja anti-ratón, y tratamiento con las concentraciones indicadas de GM-CSF en diversos momentos de tiempo.

Fig. 10A: Después de 18 h de incubación con GM-CSF.

Fig. 10B: Después de 36 h de incubación con GM-CSF.

20 **Figura 11A-B:** IRp60 inhibe la activación mediada por GM-CSF de eosinófilos humanos.

Fig. 11A: Histograma que muestra la liberación mediada por GM-CSF de IL-1 β , IL-4 y IFN- γ , que fue significativamente inhibida tras la reticulación de IRp60.

Fig. 11B: Histograma que muestra la liberación mediada por GM-CSF de IL-8, que fue completamente bloqueado tras la reticulación de IRp60.

25 **Figura 12A-12B:** IRp60 inhibe la quimiotaxis dependiente de eotaxina de eosinófilos humanos.

Fig. 12A: La gráfica muestra el número de eosinófilos después del tratamiento con anti-IRp60, anti-CCR3, isotipo (Iso) o medio rico solo (EM) que se movió hacia las diferentes concentraciones de eotaxina.

Fig. 12B: El histograma muestra el cambio de forma inducido por eotaxina en eosinófilos tras la incubación con anti-IRp60, anti-CCR3, isotipo (Iso) o medio rico solo (EM), y medido por FACS.

30 **Figura 13A-13B:** Generación y caracterización de un fragmento biespecífico F(ab')₂.

35 Fig. 13A: Con el fin de monitorizar la posible pérdida de material, las muestras de cada etapa en la síntesis del F(ab') biespecífico se ejecutaron sobre SDS-PAGE nativo [generación de Fab': kDa, marcador de tamaño; IgG, anticuerpo de partida; int, muestras de 3 etapas de filtración en gel; Fab', fragmento Fab' resultante listo para el acoplamiento]. Después del acoplamiento, el SDS-PAGE reductor se ejecutó para confirmar la complejación de BsAb [BsAb: kDa, marcador de tamaño; BsAb, anticuerpo biespecífico; IgG, controles de anticuerpo completo]. La cadena pesada de BsAb es claramente cortada a ~37 kDa.

40 Fig. 13B: Evaluación de la biespecificidad de BsAb por FACS. Se usaron anti-IgE humana, anti-IRp60 humana o IE1 para teñir tanto mastocitos humanos no sensibilizados frescos [CBMC] como células RBL sensibilizadas con IgE humana [IgE-RBL] seguido de anti-FITC de ratón. La tinción se expresó como la intensidad fluorescente media [MFI] en el canal de FL-1.

Figura 14: IE1 inhibe la desgranulación de mastocitos inducida por IgE *in vitro*.

45 Los mastocitos humanos sensibilizados con IgE se incubaron con 5 μ g/ml de IE1 o control de isotipo durante 30 min antes de la activación mediada por anti-IgE. La liberación de β -hexosaminidasa se midió usando un ensayo cromoenzimático [EM, células tratadas con medio enriquecido; X, tratamiento con anti-IgE; iso, control del mismo isotipo].

Figura 15A-15B: LE1 inhibe la liberación de triptasa en un modelo de ratón de peritonitis alérgica.

Fig. 15A: Los ratones sensibilizados con albúmina de huevo se inyectaron con 3 μ g de LE1 o control de isotipo, seguido 30 min después de la exposición a albúmina de huevo. 45 min después, los ratones se

sacrificaron y la triptasa se midió en el líquido de lavado peritoneal usando un ensayo cromoenzimático [Sal., ratones expuestos a solución salina; OVA, ratones expuestos a albúmina de huevo; LE1, pretratamiento con LE1 antes de la exposición a albúmina de huevo; Iso, pretratamiento con isotipo antes de la exposición a albúmina de huevo].

5 Fig. 15B: LE1 inhibe la liberación de eotaxina-2 en un modelo murino de peritonitis alérgica. Los ratones sensibilizados con albúmina de huevo se inyectaron con 3 µg de LE1 o control de isotipo, seguido 30 min de la exposición a albúmina de huevo. 24 h después, los ratones se sacrificaron y la eotaxina-2 se midió en el líquido de lavado peritoneal por ELISA [Solución salina, ratones expuestos a solución salina; OVA, ratones expuestos a albúmina de huevo; LE1, pretratamiento con LE1 antes de la exposición a albúmina de huevo; Iso, pretratamiento con isotipo antes de la exposición a albúmina de huevo].

Figura 16A-16B: LE1 inhibe el reclutamiento de eosinófilos en un modelo de ratón de peritonitis alérgica.

Los ratones sensibilizados con albúmina de huevo se inyectaron con 3 µg de LE1 o control de isotipo, seguido 30 min después de la exposición a albúmina de huevo. 48 h después, los ratones se sacrificaron y las células en el líquido de lavado peritoneal se normalizaron a 2×10^5 células y se tiñeron para CCR3-FITC y CD48-PE con el fin de definir mejor la población de eosinófilos.

Fig. 16A: El análisis de FACS se realizó para cuantificar el porcentaje de eosinófilos en la cavidad peritoneal.

Fig. 16B: Histograma que representa los resultados obtenidos en el análisis de FACS. [Solución salina, ratones expuestos a solución salina; OVA, ratones expuestos a albúmina de huevo; LE1, pretratamiento con LE1 antes de la exposición a albúmina de huevo; Iso, pretratamiento con isotipo antes de la exposición a albúmina de huevo].

Figura 17A-17B: LE1 inhibe la desgranulación de mastocitos en un modelo de ratón de anafilaxis cutánea pasiva.

Los ratones se sensibilizaron con anti-DNP de IgE simultáneamente con pretratamiento con LE1 o control de isotipo. 2 h después, los ratones se expusieron por bolo intravenoso de DNP a disolución de azul de Evan. La anafilaxis cutánea se evaluó visualmente por el tamaño de manchas de colorante azul [Solución salina+DNP, sin IgE; IgE+DNP, sólo IgE; IgE+LE1+DNP, sitio pretratado con LE1; IgE+isotipo+DNP, sitio pretratado con isotipo].

Fig. 17A: Sección de piel que muestra el ensayo de manchas con colorante azul.

Fig. 17B: La misma que 17A, diferente espécimen.

Descripción detallada de la invención

Las siguientes abreviaturas se usan en toda esta memoria descriptiva:

- BsAb: anticuerpo biespecífico
- CBMC: mastocitos de sangre del cordón humano
- 35 - ECP: proteína catiónica de eosinófilos
- SBF: suero bovino fetal
- HLMC: mastocitos de pulmón humano
- IE1: anticuerpo biespecífico que reconoce IRp60 y IgE
- ITAM: motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina
- 40 - ITIM: motivo inhibidor del inmunorreceptor basado en tirosina
- LE1: anticuerpo biespecífico que reconoce LMIR-1 y IgE
- mAb: anticuerpo monoclonal
- MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno
- MBP: proteína básica mayor derivada de eosinófilos
- 45 - NGF: factor de crecimiento nervioso

- SCF: factor de citoblastos
- SH2: homología 2 de Src
- Siglecs: lectinas similares a Ig de unión a ácido siálico

Aunque la alergia, y particularmente el asma, constituyen un problema sanitario creciente importante, todavía no existe ningún tratamiento eficaz, selectivo y libre de efectos secundarios para ellos.

Los presentes inventores proporcionan un enfoque novedoso para el tratamiento de alergia y asma que está prácticamente libre de efectos secundarios y es eficaz en inhibir específicamente reacciones de tipo alérgico como se demuestra en los siguientes ejemplos. La presente invención proporciona complejos biespecíficos que eligen selectivamente dianas e inhiben mastocitos y eosinófilos. Mediante la elección como dianas de las dos células clave que participan en la respuesta alérgica - mastocitos y eosinófilos -, estos complejos biespecíficos son útiles para cada alérgeno, conocido o desconocido, y para cualquier afección alérgica, por ejemplo, asma, eczema atópico, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica.

Por tanto, los complejos biespecíficos de la invención comprenden dos componentes de reconocimiento diana diferentes. Dichos componentes son preferentemente anticuerpos o un derivado los mismos, por ejemplo, scFv, F(ab), F(ab'), fragmento de unión a antígeno, etc., que están ligados mediante cualquier medio adecuado. En un ejemplo particular, como se describe en Procedimientos experimentales ("Generación de anticuerpos biespecíficos"), los componentes de reconocimiento se reticularán químicamente usando como reticulador ácido 5',5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DNTB), como se ha descrito [Graziano, R. F. y Guptill, P. (2004) Chemical production of Bispecific antibodies. En: Methods in Molecular Biology. vol. 283. Editado por C. M. Niemeyer, Human Press Inc., Totowa, NJ.].

Y, lo que es más importante, las dianas de ambos componentes de reconocimiento están localizadas en la misma célula. Una diana es la IRp60 del receptor inhibitor, o cualquier homólogo de la misma, por ejemplo, LMIR1, el homólogo de ratón [Kumagai, H. y col. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun., 307: 719-729]. La unión del componente de reconocimiento al receptor inhibitor desencadena una ruta inhibitora que produce la inhibición de la actividad de la célula diana. La especificidad del complejo se proporciona por la diana del segundo componente de reconocimiento, que siempre es una diana específica para célula. Una diana de elección es, por ejemplo, IgE, que se expresa específicamente en mastocitos. Otras dianas preferidas que son específicas para mastocitos son cKIT y FcεRI. Similarmente, un complejo que se dirige a eosinófilos tiene un segundo componente de reconocimiento que elige como diana, por ejemplo, IL-5R o CCR3. En el caso de IgE, esta inmunoglobulina se une normalmente a su receptor, FcεRI, y, por tanto, la unión del anticuerpo anti-IgE con su diana produce la activación de su receptor.

Por tanto, los complejos biespecíficos de la invención son preferentemente anticuerpos biespecíficos que eligen IRp60 como diana y una segunda diana que es específica para mastocitos y eosinófilos, además de basófilos.

Con el fin de obtener los anticuerpos biespecíficos, los inventores estudiaron primero la expresión y el mecanismo de acción de IRp60 (véanse los Ejemplos 1 a 11).

La IRp60 se caracterizó originariamente funcionalmente y molecularmente en células NK [Cantoni, C. y col. (1999) Eur. J. Immunol. 29(10): 3148-59], en las que también se mostró que la reticulación de IRp60 por anticuerpos específicos inhibe fuertemente la citotoxicidad de células NK y la actividad citolítica. Los presentes inventores muestran que la reticulación de IRp60 en mastocitos inhibe el flujo de entrada de Ca²⁺ y la liberación de mediadores. Similarmente, la reticulación de IRp60 en eosinófilos reveló que este receptor inhibitor regula la activación, supervivencia y quimiotaxia de eosinófilos. Es importante observar el hecho de que (i) la IRp60 se expresa y es funcional sobre las células efectoras de alergia, y (ii) que la participación en la regulación de respuestas alérgicas *in vivo* era totalmente inesperada especialmente debido a que este receptor inhibitor se describió originariamente como único para las poblaciones de linfocitos/NK. Además, los resultados descritos en este documento muestran que la IRp60 es un receptor inhibitor muy potente, a diferencia de FcγRIIB. Esta propiedad se explica probablemente por el hecho de que la IRp60 lleve cuatro ITIM, mientras que FcγRIIB sólo tiene uno. Además, la IRp60 es el único receptor inhibitor de la superfamilia de las Ig que es funcional sobre mastocitos y eosinófilos humanos primarios. Además, los experimentos *in vivo* descritos en este documento determinan la relevancia de dicho receptor inhibitor durante la inflamación alérgica.

Como se muestra en la Fig. 1, la IRp60 se expresa sobre mastocitos de tejido de pulmón que indica que la IRp60 puede tener una significancia funcional en la regulación de mastocitos en la salud y la enfermedad. La IRp60 también se expresa en células NK [Cantoni (1999) *id ibid.*; y datos no mostrados], linfocitos T, monocitos, granulocitos y basófilos [datos no mostrados]. Por tanto, la IRp60 puede ser un potente regulador de diversos tipos de células. La expresión de IRp60 sobre mastocitos sugiere que la respuesta de estas células en el medio inflamatorio puede regularse por este receptor. De hecho, los inventores encontraron que la expresión de IRp60 sobre mastocitos no cambia después de su cultivo con diversas citocinas o mediadores [por ejemplo, IL-3, IL-4, IL-13, TNF-α, NGF y IgE monomérica]. La Fig. 2 muestra sorprendentemente que la IRp60 se reguló por disminución por MBP derivada de eosinófilos en concentraciones inferiores a las de activación. Además, MBP indujo la regulación por disminución de varios receptores, que incluyen FcγRIIB, pero no c-kit o FcεRI en mastocitos humanos

sensibilizados con IgE [datos no mostrados]. Este hallazgo es extremadamente importante en el contexto de inflamación alérgica crónica en la que interaccionan los mastocitos y los eosinófilos. De hecho, los inventores y otros han mostrado que la MBP puede regular la activación de mastocitos [Piliponsky (2003) *id ibíd.*]. Se ha mostrado que la MBP activa CBMC co-cultivadas con fibroblastos, pero no activa significativamente CBMC en suspensión en ausencia de fibroblastos. Puede plantearse como hipótesis que la MBP regula los umbrales de activación de mastocitos manipulando la expresión de receptores inhibidores. Como se ha mencionado antes, la activación de mastocitos se mantiene lo más probablemente en un equilibrio delicado entre señales de activación, mediadas por receptores tales como FcεRI y c-kit, y señales inhibitoras mediadas por receptores tales como FcγRIIB y IRp60. Disminuyendo las señales inhibitoras, la MBP puede desplazar el equilibrio hacia la activación de mastocitos.

Se sabe que los mastocitos se activan en alergia principalmente por IgE, pero también pueden desgranularse tras la activación independiente de IgE. Por tanto, se examinó el efecto de la IRp60 sobre ambas modalidades. La reticulación de IRp60 inhibe β-hexosaminidasa, triptasa y la liberación de IL-4 de CBMC activadas con IgE, pero no la activación de CBMC mediada por el compuesto 48/80. Esto indica que la IRp60 interfiere con rutas que implican la fosforilación de tirosina, pero quizás no con rutas de la proteína G dependientes de GTP. Adicionalmente es evidente que la movilización del calcio mediada por FcεRI, la desgranulación y la síntesis de eicosanoide y citocinas dependen de acontecimientos de activación de tirosinas cinasas tempranas, especialmente la activación de Syk [Simon M y col. (2005) *J. Biol. Chem* 280:4510-7]. De acuerdo con esto, la reticulación de IRp60 pudo bloquear completamente el flujo de entrada de calcio mediado por IgE. Además, la reticulación de IRp60 inhibe la supervivencia mediada por SCF de CBMC. Estos datos no son sorprendentes ya que varios informes han demostrado la capacidad de receptores inhibidores para bloquear los efectos mediados por SCF sobre mastocitos. Por ejemplo, se mostró que FcγRIIB bloqueaba la supervivencia mediada por SCF [Malbec O y col. (2002) *Mol. Immunol.* 38:1295-9]. Además, se informó que gp49B1 disminuía la activación de mastocitos mediante SCF [Feldweg A.M. y col. (2003) *Eur. J. Immunol* 33:2262-8]. En conjunto, estos datos permiten la predicción de otras funciones de los mastocitos propensas a la inhibición por IRp60, pero todavía no se han examinado su efecto sobre funciones adicionales, tales como el reconocimiento de patrones por receptores similares a Toll y otras funciones inmunitarias.

Y, lo que es más importante, los presentes resultados fueron inesperados ya que el mecanismo de acción observado de IRp60 se diferencia significativamente del de FcγRIIB en mastocitos humanos en varios aspectos importantes. FcγRIIB contiene una única secuencia de ITIM, mientras que IRp60 contiene 4 ITIM, tres de los cuales son canónicos (a continuación de la consenso I/S/L/V-x-Y-x-x-L/V), pero no el cuarto [Cantoni (1999) *id ibíd.*]. La función real de este ITIM como sitio de acoplamiento para el posterior reclutamiento de fosfatasa todavía no está clara, aunque puede experimentar fosforilación de tirosina [datos no mostrados]. Otra diferencia es que se ha mostrado que la IRp60 sólo recluta SHP-1 y SHIP-1, pero no SHP-2. Esta observación soporta los datos recientemente informados en los que IgSF13, un miembro cercano de la familia de la IRp60, sigue el mismo patrón de despliegue de fosfatasas [Sui L. y col. (2004) *Biochem Biophys. Res. Commun* 319:920-8]. Aunque existe la posibilidad del reclutamiento de fosfatasas diferencial por diversos receptores inhibidores, el significado de este resultado todavía necesita investigarse.

Por tanto, los anticuerpos biespecíficos descritos en la presente invención, o composiciones que comprenden los mismos, se diseñan para activar selectivamente un mecanismo inhibitor (ruta) sobre mastocitos y eosinófilos, las dos células efectoras clave de la alergia, desencadenando así selectivamente rutas inhibitoras sólo en estas células diana. Dicha inhibición se hace mediante la inhibición de su función o actividad, como se detalla más adelante.

Como actividad (o función) de mastocitos o eosinófilos se entiende uno cualquiera de los siguientes procesos: maduración, supervivencia, desgranulación, cebado (preparación de la célula para la acción, poniéndola en aviso de emergencia), quimiotaxia, adherencia, proliferación y síntesis de citocinas, factores de crecimiento, metabolitos de ácido araquidónico, quimiocinas, metabolitos de fosfolípido y otros. La activación de estos procesos depende de la estimulación (es decir, inducción o activación) de un receptor, que es específico para estas células. Además, cualquiera de estos procesos puede usarse como parámetro para determinar la capacidad del complejo biespecífico para inhibir la actividad de mastocitos o eosinófilos y para tratar afecciones inducidas por las reacciones de tipo alérgico y reacciones mediadas por mastocitos/eosinófilos.

Por tanto, la ruta inhibitora que se activa mediante la unión del complejo biespecífico (por ejemplo, el anticuerpo biespecífico descrito en la invención) a sus dos dianas - la IRp60 del receptor inhibitor y la segunda, la diana activadora - puede describirse por la siguiente cascada de acontecimientos que ocurren consecutivamente o concomitantemente: (a) fosforilación de los dominios intracelulares de ITIM del receptor inhibitor; (b) reclutamiento de fosfatasas intracelulares, por ejemplo, SHP-1, SHP-2, SHIP-1, SHIP-2 o PTEN; (c) desfosforilación de ITAM o dominios de fosforilación de tirosina presentes en la diana activadora.

Por tanto, el anticuerpo biespecífico descrito en este documento puede usarse *in vivo* o *ex vivo* en el tratamiento de reacciones de tipo alérgico y reacciones mediadas por mastocitos/eosinófilos, y cualquier afección derivada de hiperactividad o hiperplasia por mastocitos/eosinófilos.

Con el fin de investigar la relevancia biológica de la activación de IRp60 *in vivo*, los inventores neutralizaron este receptor en un modelo murino de peritonitis alérgica (Ejemplos 7 y 14). La IRp60 es una isoforma alélica de CMRF-

35H [Cantoni C y col. (1999) Eur. J. Immunol. 29:3148-59]. Ya que todavía no se ha atribuido función *in vivo* a la IRp60, se mostró que un miembro de la familia de CMRF-35H murino [llamado CLM-1] inhibía la formación de osteoclastos por el reclutamiento de SHP-1 [Chung, D. H. y col. (2003) J. Immunol. 171(12):6541-8]. Recientemente se ha informado que los mastocitos murinos expresan un receptor de la superfamilia de las Ig llamado LMIR1 [Kumagai (2003) *id ibíd.*] que es el 80% idéntico a IRp60 humana, con los residuos funcionales importantes en el pliegue de la Ig de tipo V y las secuencias de ITIM bien conservadas, y puede reclutar SHP-1 y -2 mediante la fosforilación de tripsina. Los presentes resultados indican que la neutralización de LMIR1 potencia los niveles de tripsina y β -hexosaminidasa en el lavado peritoneal de ratones tratados con LMIR1. Además, se aumentó la consiguiente inflamación eosinofílica. Esto indica que la IRp60 (y su ligando todavía no definido) también tienen una función en el entorno alérgico *in vivo*.

Finalmente, con el fin de examinar el efecto de la reticulación de IRp60 y IgE tanto *in vitro* como *in vivo*, los inventores han generado dos conjuntos de construcciones biespecíficas (IE1, anti-IRp60-anti-IgE biespecífico; LE1, anti-LMIR1-anti-IgE biespecífico) y sus controles del mismo isotipo. IE1 inhibió la desgranulación mediada por IgE de mastocitos humanos *in vitro*, mientras que LE1 inhibió la liberación de tripsina y eotaxina-2, y la infiltración eosinofílica en un modelo murino de peritonitis alérgica. Además, LE1 inhibió la anafilaxis cutánea en un modelo de PCA murina. Esto demuestra que la reticulación de IRp60 y IgE (o LMIR1 y IgE) es una forma eficiente para inhibir la función y actividad de mastocitos y eosinófilos en entornos alérgicos-inflamatorios.

Como se usa en este documento en la memoria descriptiva y en la sección de reivindicaciones más adelante, el término "tratar" o tratamiento y sus derivados incluyen sustancialmente inhibir, reducir o invertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos de una afección.

La composición farmacéutica usada mediante el procedimiento de la invención puede prepararse en formas de unidades de dosificación y puede ser preparada por cualquiera de los procedimientos muy conocidos en la técnica de la farmacia. Además, la composición farmacéutica puede comprender adicionalmente aditivos farmacéuticamente aceptables tales como vehículo, excipiente o estabilizador farmacéuticos aceptables, y opcionalmente otros constituyentes terapéuticos. Naturalmente, los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

Por supuesto, la magnitud de la dosis terapéutica de la composición de la invención variará con el grupo de pacientes (edad, sexo, etc.), la naturaleza de la afección que va a tratarse y con la vía de administración, debiendo ser todo determinado por el médico adjunto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse sistémicamente, por ejemplo, por inyección parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular. Alternativamente, la composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía adecuada que incluye administración subcutánea, transcutánea, tópica, intraarticular, subconjuntiva o mucosa, por ejemplo, oral, intranasal, inhalada o intraocular. La administración local al área en necesidad de tratamiento puede lograrse, por ejemplo, por infusión local durante la cirugía o administración tópica.

Para administración por vía oral, la preparación farmacéutica puede ser en forma líquida, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o en forma sólida como comprimidos, cápsulas y similares. Para administración por inhalación, las composiciones se administran convenientemente en forma de gotas o esprays en aerosol. Para administración mediante inyección, las formulaciones pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con un conservante añadido.

Por tanto, los anticuerpos biespecíficos de la invención tienen dos ventajas terapéuticas y financieras principales que van unidas. Primero, no son específicos para alérgeno, por tanto, podrían usarse en pacientes alérgicos a más de un alérgeno y aunque el (los) alérgeno(s) fuera(n) desconocido(s) como ocurre frecuentemente en entornos clínicos. Segundo, en los futuros usos terapéuticos puede administrarse tópicamente por esprays, cremas, gotas oculares y nasales, etc., y no por la incómoda vía intravenosa. Las vías intravenosas también se evitan esperanzadoramente debido a que (1) hay un mayor riesgo de efectos secundarios; (2) farmacocinéticamente, la semivida del fármaco es más corta, normalmente debido a que el fármaco se eliminará, secretará, disgregará, etc.; y (3) se necesita significativamente menos fármaco si se administra localmente.

La cantidad de la composición terapéutica o farmacéutica de la invención que es eficaz en el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno particular dependerá de la naturaleza de la enfermedad, afección o trastorno y puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Además, los ensayos *in vitro*, además de los experimentos *in vivo*, pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad, afección o trastorno, y debe decidirse según el juicio del médico y cada circunstancia del paciente. Dosis eficaces pueden extrapolarse de las curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales. La cantidad debe ser suficiente para inhibir uno de los procedimientos que permiten que un mastocito o un eosinófilo desencadenen una reacción de tipo alérgico. Para el modelo murino descrito en este documento, 3 μ g del anticuerpo biespecífico LE1 fueron suficientes para inducir dicha respuesta, que es el

equivalente de aproximadamente 27 pmoles.

Como se usa en este documento, "cantidad eficaz" significa una cantidad necesaria para lograr un resultado seleccionado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de la composición de la invención útil para la inhibición de la actividad de mastocitos o eosinófilos y, por tanto, para el tratamiento de reacciones de tipo alérgico, además de reacciones de mastocitos y/o eosinófilos y/o mediadas por basófilos.

Debe apreciarse que el anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal.

La generación de anticuerpos policlonales contra proteínas se describe en el Capítulo 2 de Current Protocols in Immunology, Wiley and Sons Inc.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse a partir de linfocitos B tomados del bazo o ganglios linfáticos de animales inmunizados, en particular ratas o ratones, por fusión con linfocitos B inmortalizados en condiciones que favorecen el crecimiento de células híbridas. La técnica de generación de anticuerpos monoclonales se describe en muchos artículos y libros de texto tales como el Capítulo 2 anteriormente observado de Current Protocols in Immunology. Las células del bazo o ganglio linfático de estos animales pueden usarse de la misma forma que las células del bazo o ganglio linfático de animales inmunizados con proteínas para la generación de anticuerpos monoclonales como se describe en el Capítulo 2 en su interior. Las técnicas usadas en la generación de anticuerpos monoclonales se describen adicionalmente en Kohler y Milstein [Kohler y Milstein (1975) Nature 256; 495-497] y en el documento US 4.376.110.

Fab y F(ab')₂ y otros fragmentos de anticuerpos se producen normalmente por escisión proteolítica usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Estructuralmente, los anticuerpos biespecíficos descritos en la presente invención pueden definirse del siguiente modo. Un fragmento F(ab')₂ sintético (es decir, un conjugado de 2 fragmentos F(ab)'), reconociendo cada uno de ellos un determinante diferente), se generó por un procedimiento de tres etapas: (1) tratar moléculas de IgG completa de ratón o de rata (específicas para cada una de las dianas de interés, como se define en este documento) con pepsina, generándose así fragmentos F(ab')₂; (2) reducir cada F(ab')₂ mediante tratamiento con 2-mercaptoetilamina, generando fragmentos F(ab'); y (3) re-conjugar los fragmentos F(ab') de cada anticuerpo con el otro, generándose así el híbrido biespecífico F(ab')₂. Por tanto, dicho anticuerpo biespecífico es en todos los aspectos una molécula de F(ab')₂ completa, ~ 110 KDa de peso, considerando que una molécula de F(ab')₂ se define como el producto de tratamiento con pepsina de una molécula de IgG.

Para las futuras aplicaciones clínicas, los biespecíficos de la invención pueden mejorarse mediante un procedimiento de humanización para vencer la respuesta del anticuerpo humano al anticuerpo de ratón. Recientemente se han desarrollado nuevas estrategias rápidas para la humanización de anticuerpos que pueden aplicarse para tal anticuerpo. Estas tecnologías mantienen la afinidad y retienen la especificidad por antígeno y epítipo del anticuerpo original [Rader, C. y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 8910-8915; Mateo, C. y col. (1997) Immunotechnology 3: 71-81]. A diferencia de, por ejemplo, los anticuerpos derivados de animales, los anticuerpos "humanizados" no experimentan frecuentemente reacción no deseable con el sistema inmunitario del sujeto.

Por tanto, como se usa en este documento, el término "humanizado" y sus derivados se refieren a un anticuerpo que incluye cualquier porcentaje superior a cero y hasta el 100% de material de anticuerpo humano, en una cantidad y composición suficiente para hacer que sea menos probable que un anticuerpo tal sea inmunogénico cuando se administra a un ser humano. Se entiende que el término "humanizado" también estudia anticuerpos derivados de humano o anticuerpos derivados de células no humanas genéticamente manipuladas para incluir partes funcionales de los genes que codifican el sistema inmunitario humano, produciéndose así anticuerpos que son completamente humanos.

En resumen, los anticuerpos biespecíficos descritos en este documento representan un enfoque novedoso para la modulación por disminución de funciones efectoras de mastocitos y eosinófilos en enfermedades inflamatorias alérgicas en general y en enfermedades relacionadas con mastocitos/eosinófilos tales como asma alérgico, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica estacional, dermatitis atópica y eczema atópico, trastornos alérgicos y respuestas a diversos alergenos, anafilaxia sistémica, mastocitosis sistémica, morfea/urticaria pigmentosa, leucemia de mastocitos, aterosclerosis, rechazo de injerto, esclerosis múltiple, enfermedades pulmonares fibróticas, neurofibromatosis, queloides, esclerodermia, artritis reumatoide, osteoartritis, gota aguda, penfigoide cicatricial ocular, enfermedad de Crohn, adhesiones peritoneales, enfermedad crónica de injerto frente a huésped (GVHD), síndrome de eosinofilia-mialgia, asma bronquial extrínseco, poliposis nasal, granulomatosis de Wegener, asma bronquial intrínseco, enfermedades pulmonares intersticiales y otras enfermedades pulmonares, neumonía eosinofílica crónica, neumonitis por hipersensibilidad, aspergilosis broncopulmonar alérgica, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, toxocariasis, filariasis, esquistosomiasis, triquinosis, enfermedades neoplásicas y mieloproliferativas, linfomas de linfocitos T y enfermedad de Hodgkin.

Una población particular que podría beneficiarse de la presente invención es la de individuos que padecen mastocitosis. La mastocitosis es un grupo de trastornos caracterizados por la presencia de demasiados mastocitos en el cuerpo. Puede ser cutánea o sistémica. El exceso de mastocitos y su señalización producen dolor óseo y

muscular, molestia abdominal, náuseas y vómitos, úlceras de estómago, diarrea, lesiones de la piel, episodios de tensión arterial muy baja y mareos y choque. Hasta este momento no hay tratamiento específico para la mastocitosis. El tratamiento se basa normalmente en antihistamínicos o medicinas para aliviar las manifestaciones sintomáticas de la enfermedad. Sin embargo, no se ha encontrado tratamiento específico para los mastocitos. Por tanto, los anticuerpos biespecíficos de la invención que eligen los mastocitos como diana, o composiciones que comprenden los mismos, son el agente ideal que va a usarse para el tratamiento de dicha enfermedad.

Las afecciones mediadas por la activación de basófilos también son posibles dianas que van a tratarse con los anticuerpos biespecíficos de la invención, ya que se cree que estas células desempeñan funciones que se solapan con las de los mastocitos. Los basófilos presentan muchas características en común con los mastocitos, especialmente la expresión del receptor de IgE de alta afinidad FcεR1, y un alto contenido de histamina y triptasa almacenadas en gránulos. Además, los basófilos expresan altos niveles de IRp60 (datos no mostrados por los inventores). Como la activación de activación dependiente de IgE puede inhibirse por el receptor inhibidor FcγRIIB, es muy probable que la unión del anticuerpo biespecífico a IRp60/IgE también deba desencadenar la ruta inhibidora en estas células. Afecciones particulares que pueden tratarse con los anticuerpos biespecíficos de la invención son respuesta anafiláctica a medios de contraste, respuesta anafiláctica a relajantes musculares y leucemias basófilas.

El potencial de los anticuerpos biespecíficos descritos en este documento puede incluso exceder el alcance tratado anteriormente. Dados los mecanismos efectores apropiados sobre otras células, es imaginable que pudieran tratarse otras enfermedades tales como enfermedades autoinmunitarias en las que se desea la elección de diana al milímetro de tipos de células específicos.

La presente invención se define por las reivindicaciones, cuyo contenido debe entenderse como incluido dentro de la divulgación de la memoria descriptiva.

Desvelada y descrita, debe entenderse que la presente invención no se limita a los ejemplos particulares, etapas de procedimiento y materiales desvelados en este documento ya que tales etapas de procedimiento y materiales pueden variar algo. También debe entenderse que la terminología usada en este documento se usa con el fin de sólo describir realizaciones particulares y no está prevista que sea limitante ya que el alcance de la presente invención sólo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

Debe observarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario.

En toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implica la inclusión de un número entero establecido o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Los siguientes ejemplos son representativos de técnicas empleadas por los inventores en la realización de aspectos de la presente invención. Debe apreciarse que mientras que estas técnicas son a modo de ejemplo de realizaciones preferidas para la práctica de la invención, aquellos expertos en la materia, en vista de la presente divulgación, reconocerán que pueden hacerse numerosas modificaciones sin apartarse del espíritu y el alcance previsto de la invención.

Ejemplos

Procedimientos experimentales

- Anticuerpos y reactivos

Todos los medios de cultivo celular, reactivos y tampones se compraron de Biological Industries, Beit Haemek, Israel. SCF es una amable donación de Amgen, Inc. [Thousand Oaks, CA, EE.UU.]. Los siguientes mAb que reconocen diversos receptores inhibidores se produjeron por procedimientos convencionales descritos en la bibliografía y se usaron: P192 y E59 [anti-IRp60], XA-185 [anti-CD94], 11PB6 [anti-p58.1], GL183 [anti-p58.2], Z27 [anti-p70], Q66 [anti-p140], AZ158 [anti-p70/p140], F278 [anti-LIRIIIILT2]. El anticuerpo que reconoce LIR3/ILT5 [15F3] fue amablemente proporcionado por Colonna M., Washington University, St Louis. Anti-LMIR1 se compró de R&D Systems [Mineápolis, MN, EE.UU.]. El anticuerpo anti-CD117 humano para la purificación de mastocitos de pulmón humano se compró de BD-Pharmingen [San Diego, CA, EE.UU.]. Los anticuerpos anti-triptasa humana [clon AA1] y de control de isotipo [IgG1 y IgG2A] se compraron de Dako [Glostrup, Dinamarca]. El anticuerpo de oveja anti-F[ab']₂ de ratón se compró de ICN Biomedicals [Aurora, OH, EE.UU.]. El anticuerpo quimérico anti-NP de IgE murina/humana se compró de Serotec [Raleigh, NC, EE.UU.]. El anticuerpo de cabra específico para anti-cadena λ de ratón se compró de Southern Biotech [Birmingham, AL, EE.UU.]. Los anticuerpos policlonales anti-fosfotirosina humana [pY99], SHP-1/2 y SHIP-1 se compraron de Santa Cruz [Santa Cruz, CA, EE.UU.]. Los anticuerpos anti-conejo y anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante, isotiocianato de fluoresceína, anti-ratón conjugados con [FITC], Cy⁵ y ficoeritrina se compraron todos de Jackson Laboratories [West Grove, PA, EE.UU.]. Los sustratos cromogénicos se compraron de Sigma [St. Louis, MO, EE.UU.]. Calcium Green-1AM se compró de Molecular Probes [Eugene, OR, EE.UU.]. Ficoll-Paque se compró de Amersham Biosciences [Uppsala, Suecia].

Todos los otros reactivos se compraron de Sigma, a menos que se establezca de otro modo, y fueron de la mejor calidad química disponible.

- *Generación de anticuerpos biespecíficos [BsAb]*

5 El fragmento F(ab')₂ biespecífico que se deriva de anticuerpos IgG de rata o de ratón completos que reconocen epítopes separados se generó básicamente como se ha descrito por Brennan y Graziano con ligeras modificaciones. Los anticuerpos de ratón anti-IgE humana y anti-IRp60 humana se digirieron usando perlas de pepsina inmovilizadas según el protocolo del fabricante como se ha descrito durante 4 h a 37°C en un baño con agitación. Los fragmentos F(ab')₂ se purificaron usando filtración centrífuga en gel sobre una columna Vivaspin y se redujeron a fragmentos Fab' incubando en tampón de reducción [EDTA 1 mM, 2-mercaptoetilamina 1 mM, arsenito de sodio 10 mM, fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,8] durante la noche a 25°C. Al anti-IRp60 solo se añadió ácido 5',5-ditiobis[2-nitrobenzoico] [reactivo de Ellman] a un volumen final de 10 mM, y la incubación continuó durante 4 h a 25°C. Entonces, ambos anticuerpos se purificaron por filtración en gel, se transfirieron a tampón de acoplamiento [EDTA 1 mM, fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,8], se mezclaron y se incubaron durante la noche a 25°C. El F(ab')₂ resultante se purificó por filtración en gel, se recuperó en PBS y se cuantificó usando espectrofotometría. Las especificidades se evaluaron por FACS. Para IgE de ratón y LMIR1, la IgG de rata se sometió al mismo procedimiento, excepto durante 5 h de incubación con pepsina inmovilizada. Se crearon BsAb que reconocen los siguientes conjuntos diana: IE1 [hlgE-IRp60], isotipo de hlgE [control], LE1 [mlgE-LMIR1], isotipo de mlgE [control].

- *Procedimientos para ensayos con mastocitos*

a. *Purificación y cultivo de mastocitos*

20 Es de notar que la mayoría del conocimiento hasta la fecha sobre los mastocitos se basa en estudios realizados en mastocitos de roedores y líneas de mastocitos humanos. En el laboratorio de los inventores, que se basa en terapia humana, se ha desarrollado la tecnología para purificar y cultivar específicamente mastocitos humanos a partir de sangre del cordón, pulmón, piel e intestino.

25 Por tanto, se obtuvieron mastocitos de sangre del cordón humano [CBMC] cultivando precursores mononucleares de sangre del cordón umbilical como se ha descrito previamente [Piliiposky (2003) *id ibíd.*]. Brevemente, sangre del cordón fresca se diluyó con disolución de Hank, se cargó sobre Ficoll-Paque y se centrifugó [350 x g, 25 min]. Las células mononucleares se lavaron dos veces con Hank y se resuspendieron con 100 ml de medio esencial mínimo [MEM]-alfa que contenía 10% v/v de suero bovino fetal inactivado por calor [SBF], penicilina [100 U/ml], estreptomina [100 µg/ml], ribonucleósidos/desoxirribonucleósidos, SCF [100 ng/ml], IL-6 [10 ng/ml] [Peptotech, Rocky Hill, NJ, EE.UU.] y PGE₂ [0,3 µM] [Sigma]. El medio de cultivo se cambió semanalmente. Se usaron CBMC después de 8-12 semanas de cultivo, cuando >97% de las células fueron positivas para triptasa como se evalúa por citometría de flujo intracelular [FACS, véase más adelante]. Los mastocitos de pulmón humano [HLMC] se purificaron de especímenes de pulmón que parecían sanos extirpados quirúrgicamente de pacientes con cáncer de pulmón usando proteólisis, gradiente y clasificación magnética positiva como se ha descrito [Piliiposky AM. y col. (2003) *id ibíd.*]. Las muestras de pulmón y la sangre del cordón se obtuvieron según las pautas del Comité institucional de Helsinki de la Hadassah Medical School (Jerusalén, Israel) y su uso fue autorizado por el comité.

b. *Citometría de flujo [FACS]*

35 Se realizó citometría de flujo usando Becton-Dickinson FACScalibur y el software CellQuest. Todas las etapas se realizaron en una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo [Nunc, Roskilde, Dinamarca] en un volumen de 100 µl. La mayoría de las células [~10⁵/muestra] se lavaron con tampón HBA frío en hielo [disolución de Hank que contiene BSA [0,1% peso/volumen] y NaN₃ [0,01% peso/volumen]], luego se incubaron con tanto anti-IRp60 como el control de isotipo apropiado [4°C, 30 min], seguido de dos lavados con HBA frío. Entonces, las células se incubaron con anticuerpos secundarios [anti-ratón conjugado con FITC o Cy⁵ a las diluciones recomendadas, 4°C, 30 min] seguido de dos lavados adicionales, y se analizaron inmediatamente por FACS. La FACS intracelular se realizó esencialmente igual, excepto las dos etapas antes de la adición del anticuerpo primario. En este caso, las células se fijaron primero en 2% de formaldehído [4°C, 10 min] y se bloquearon con HBA que contenía BSA [10% peso/volumen], suero de cabra [0,1% v/v], saponina [0,1% peso/volumen] y HEPES [10 mM] [4°C, 10 min]. También se emplearon HBA que contiene saponina [0,1% peso/volumen] y HEPES [10 mM] para la incubación y el lavado.

c. *Activación e inhibición de mastocitos*

50 Cinco días antes de activación, las CBMC se incubaron con anticuerpo quimérico anti-NP de IgE murina/humana [5 µg/ml]. Para la activación se incubó una placa de 96 pocillos Immunolon-2HB [ThermoLabsystems, Franklin, MA, EE.UU.] con o sin anticuerpo de oveja anti-F[ab']₂ de ratón [25 µg/ml en PBS] [37°C, 4 h], seguido de 2 lavados con PBS. A continuación, la placa se incubó con anti-IRp60 [20 µg/ml], control de isotipo o PBS [37°C, 4 h] y se lavó dos veces con PBS. En el día de la activación, las células [2x10⁵ células/muestra] se lavaron dos veces en tampón de gelatina Tyrode-calcio caliente [NaCl 137 mM, NaHCO₃ 12 mM, L-glucosa 5,5 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, 0,1% peso/volumen de gelatina, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 0,9 mM] complementado con SCF [100 ng/ml]. Entonces, las células se transfirieron a la placa recubierta, y se añadieron tanto anticuerpo específico para la cadena λ de anti-IgE de ratón [5 µg/ml] como compuesto 48/80 [10 µg/ml], y las células se incubaron durante 30 min a 37°C. Finalmente,

las células se centrifugaron inmediatamente [1500 x g, 1 min], se separaron del sobrenadante y se lisaron por 3 ciclos de congelación/descongelación. El sobrenadante y el lisado se recuperaron y se guardaron a -80°C hasta que se evaluaron para las cantidades de mediadores liberados.

d. Ensayos de liberación de mediadores

5 Se midieron β -hexosaminidasa y triptasa por ensayos cromogénicos como se ha descrito [Woolhiser, M.R. y col. (2004) Clin. Immunol. 110(2):172-80; Greenfeder S. y col. (2003) Biotechniques 34(5):910-2, 914] con ligeras modificaciones. Para la β -hexosaminidasa, 18 μ l de muestra [sobrenadante o lisado celular] se mezclaron con 42 μ l de disolución de sustrato [p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida 8 mM en ácido cítrico 48 mM y Na₂HPO₄ 56 mM, pH 4,5] y se incubaron durante 2 h a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 120 μ l de glicina fría en hielo [0,2M] a pH 10,7 y la D.O. se leyó inmediatamente en un espectrofotómetro convencional a 410 nm de absorbancia. Para la triptasa, 48 μ l de muestra se mezclaron minuciosamente con 2 μ l de disolución de sustrato [N-p-tosil-gly-pro-lys-p-nitroanilida 25 mM en 100% de DMSO], se incubaron a 37°C hasta la cromogénesis y se leyeron inmediatamente como antes. La liberación en porcentaje se calculó usando la siguiente fórmula: % de R = 100 x sobrenadante / [lisado + sobrenadante] dentro del intervalo lineal de la curva de D.O. La liberación de IL-4 se midió por un kit de ELISA comercial [Diacclone, Besangon, Francia].

e. Ensayo de supervivencia

Se lavaron CBMC [2x10⁵ células/muestra] con MEM-alfa sin factores de crecimiento y se incubaron en 200 μ l de MEM-alfa con o sin SCF [100 ng/ml] en una placa de cultivo recubierta como se ha descrito anteriormente. Muestras de 24 y 48 h se tiñeron mediante la adición de 5 μ l de disolución de yoduro de propidio en PBS [10% v/v] y se analizaron inmediatamente por FACS.

f. Modulación de la expresión de receptores

Se cultivaron CBMC [3x10⁵ células/muestra] en presencia de tanto TNF- α [20 ng/ml], IL-3 [20 ng/ml], IL-4 [20 ng/ml], NGF [50 ng/ml] [todos comprados de Peprotech, Rocky Hill, NJ, EE.UU.], IgE quimérica [5 μ g/ml] [Serotec], MBP de eosinófilos [0,01-0,1 μ M], se purificaron como se ha descrito [Piliponsky (2003) *id ibíd.*], o poli-L-arginina [25-100 nM] durante 0, 4, 12 y 24 h a 37°C. A estos momentos de tiempo, la expresión de IRp60 se evaluó por FACS.

g. Movilización de Ca²⁺ intracelular

Antes de cargar con sensor de calcio, la IRp60 sobre CBMC [3x10⁵ células/muestra] se reticuló por incubación con anti-IRp60 o isotipo [10 μ g/ml, 30 min sobre hielo], seguido de lavado e incubación con anticuerpo de oveja anti-F[ab']₂ de ratón [25 μ g/ml, 30 min sobre hielo] en MEM-alfa. Las células se cargaron con Calcium Green-1AM [5 μ M, 45 min, 37°C] en MEM-alfa [SBF, 2% v/v], se lavaron y se suspendieron en 400 μ l de tampón de gelatina Tyrode-calcio calentado a 37°C. Se dejó que las células circularan libremente en el citómetro durante 100 s, momento en el que se añadió anti-IgE [5 μ g/ml]. Los cambios en la media geométrica de FL-1 se registraron durante un total de 5 min.

h. Inmunoprecipitación y transferencia Western

35 Se lisaron CBMC usando un tampón de lisis comercial [Pierce, Rockford, IL, EE.UU.], se ejecutaron sobre 10% de SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF [Pierce] y se transfirieron frente a IRp60 [anti-IRp60, 1 μ g/ml]. Para la precipitación de IRp60, CBMC [8x10⁶ células/muestra] se trataron con ortovanadato de sodio [4 mM, 10 min, 37°C] o se incubaron en una placa recubierta durante diversos periodos de tiempo. La IRp60 se precipitó en CBMC usando un kit comercial [kit de mamífero clásico Seize™, Pierce] según las instrucciones del fabricante. Las muestras se ejecutaron como se ha descrito y se transfirieron frente a fosfotirosina [pY99], SHP-1/2 y SHIP-1. Para la detección, anticuerpos anti-ratón o anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante se usaron como se recomendó por el fabricante.

- Procedimientos para ensayos con eosinófilos

a. Purificación de eosinófilos

45 Se purificaron eosinófilos de la sangre periférica de individuos levemente atópicos (niveles de eosinófilos en sangre, 5-10%). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los voluntarios según las pautas establecidas por el Comité de Helsinki de experimentación humana de la Universidad Hadassah-Hebrew. Brevemente, se recogió sangre venosa (50-100 ml) en jeringuillas heparinizadas y se dejó que sedimentaran en 6% de dextrano (Amersham Biosciences). Se centrifugaron leucocitos sobre Ficoll-Hypaque (densidad, 1,077; 25 min, 700 g, 22°C; Amersham Biosciences). Los neutrófilos y los linfocitos contaminantes se marcaron en el sedimento enriquecido en granulocitos con microperlas magnéticas unidas a Abs anti-CD16 y anti-CD3 (Miltenyi Biotec). Los eosinófilos se purificaron pasando la suspensión de células a través de una columna magnética (MACS). Las células se recogieron a una pureza de al menos el 98% por tinción de Kimura con una viabilidad de al menos el 98% por tinción con azul de tripano. No se observaron células CD56+ ni CD3+ en las fracciones contaminantes por análisis de FACS (datos no mostrados).

b. *Citometría de flujo*

5 Para el análisis de citometría de flujo (FACS) se incubaron células (1×10^5) en 15% de suero humano (para bloquear FcR) en un volumen final de 100 μ l de HBSS complementado con 0,1% de BSA y 0,02% de azida de sodio (HBA) durante 30 min sobre hielo. Los eosinófilos se cultivaron con diferentes Abs que reconocían receptores inhibidores, seguido de Abs de cabra anti-FITC de ratón (1/200). Para los experimentos de supervivencia se realizó tinción con anexina-PI usando el kit de anexina-PI de R&D según las instrucciones del fabricante.

Después de la tinción, las células se analizaron en un sistema FACSCalibur (BD Biosciences). Para cada tinción se recogieron al menos 10.000 acontecimientos y el análisis de datos se realizó usando el software CellQuest (BD Biosciences)

10 c. *Cultivo y activación celular*

15 Se recubrieron previamente noventa y seis placas de pocillos (Nunc) con anticuerpo de oveja anti-F(ab')₂ de ratón en PBS (25 μ g/ml, 2 h, 37°C, 5% de CO₂). Después, las placas se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con P192 (anti-IRp60) o Ab de control del mismo isotipo irrelevante (1-5 μ g/ml, 2 h, 37°C, 5% de CO₂) y se lavaron de nuevo tres veces. Los eosinófilos recientemente aislados se sembraron en estos pocillos previamente recubiertos (2×10^5 /200 μ l) en medio que contenía RPMI 1640, 200 U/ml de penicilina, 200 μ g/ml de estreptomina y 5% (v/v) de SBF inactivado por calor (medio enriquecido (EM)), y se añadió IL-5 o GM-CSF a diferentes concentraciones (1-100 ng/ml). Las células se incubaron durante 18-24 h (37°C, 5% de CO₂). Al final de la incubación, las células se centrifugaron (250 g, 5 min, 4°C) y los sobrenadantes se recogieron, se tomaron alícuotas y se guardaron a -80°C hasta que se evaluaron para citocinas o ensayos de proliferación de fibroblastos.

20 Para los ensayos de supervivencia, las células se activaron en suspensión del siguiente modo: se añadió P192 (anti-IRp60) o Ab de control del mismo isotipo irrelevante a las células (2×10^5 , 1-5 μ g/ml, 30 min, 4°C). Las células se lavaron y se añadió anticuerpo de oveja anti-F(ab')₂ de ratón (25 μ g/ml, 30 min, 4°C). Después, las células se lavaron tres veces (250 g, 5 min, 4°C) y se añadió IL-5 o GM-CSF (1-100 ng/ml) durante diferentes momentos de tiempo (12-48 h). La viabilidad se evaluó por citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

25 d. *Determinación de citocinas*

Se cuantificó IL-8 en los sobrenadantes de cultivo de eosinófilos usando DuoSet (R&D Systems). Los límites más bajos para la sensibilidad del ensayo fueron 7 pg/ml para IL-8. IL-1b, IFN- γ y IL-4 se detectaron usando el kit FlowCytomix que detectó 10 citocinas diferentes según las instrucciones del fabricante.

e. *Ensayo de quimiotaxia*

30 Se midió la migración de eosinófilos usando una sistema de cámara dual de micropocillos (cámara ChemoTx: tamaño de poro del filtro 5 μ m, pocillos de 60 mm de diámetro; Neuro Probe Inc. Gaithersburg, MD). Se añadió eotaxina humana recombinante (1-100 ng/ml) por triplicado a los pocillos en la cámara inferior y se cubrió con un filtro de marco. A continuación, las suspensiones de eosinófilos que se activaron por anti-IRp60 o control del mismo isotipo (30.000 células/30 μ l) se colocaron encima del filtro sobre cada pocillo y el sistema de cámara se incubó durante 90 min (37°C, 5% de CO₂). Después de la incubación, la suspensión de eosinófilos no migrada encima del filtro se eliminó usando papel tisú y las células en la cámara inferior se contaron por citometría de flujo (FACSCalibur, Beckton Dickinson). Brevemente, se obtuvieron recuentos relativos de células adquiriendo eventos durante 60 segundos.

f. *Ensayo de cambio de forma*

40 El cambio de forma de los eosinófilos inducido por eotaxina se evaluó usando análisis por citometría de flujo. Las suspensiones de eosinófilos que se activaron por anti-IRp60 o control del mismo isotipo se incubaron con eotaxina humana recombinante (1-100 ng/ml) durante 5-10 min (37°C, 5% de CO₂). Después, las células se lavaron y se analizaron por medio de citometría de flujo (FACSCalibur, Beckton Dickinson) y se adquirió el FSC de 10.000 células.

g. *Ensayo de proliferación de fibroblastos*

45 La proliferación de la monocapa de fibroblastos subconfluente se evaluó por incorporación de [³H]-timidina. Los fibroblastos se sembraron en placas de 96 pocillos (5×10^3 células/pocillo) en 200 ml de DMEM complementado/SBF al 10% durante la noche, se lavaron dos veces con DMEM complementado/SBF al 0,5% y se estimularon con sobrenadantes de eosinófilos que se activaron por IRp60 o controles del mismo isotipo durante 24 h. Se añadió [³H]-timidina (NENTM Life Science Products, Inc., Boston, MA) como pulso final de 24 h (1 μ Ci/pocillo) y las muestras se procesaron como se ha descrito previamente.

- *Animales y modelo de peritonitis alérgica*

Se indujo peritonitis alérgica en ratones BALB/c hembra de 8-10 semanas de edad usando albúmina de huevo [OVA] como se ha descrito [Zuany-Amorim y col. (1994) Ann NY Acad Sci 725:34-43]. Brevemente, en los días 0 y 7 los ratones se sensibilizaron intradérmicamente con 100 μ g de OVA adsorbida sobre 1,6 mg de hidróxido de aluminio en

300 µl de solución salina. Los ratones se expusieron intraperitonealmente a 30 µg de OVA en 300 µl de solución salina en el día 11, y luego se sacrificaron tanto 45 min como 48 h después para el análisis de mediadores y la cuantificación de eosinófilos, respectivamente. La cavidad peritoneal se lavó con 5 ml de tampón de gelatina Tyrode sin calcio. El líquido de lavado peritoneal se centrifugó [150 x g, 5 min] y los sedimentos de células se resuspendieron en 2 ml de tampón de gelatina Tyrode para el análisis de mediadores y la cuantificación de eosinófilos. En todos los experimentos se administró anti-LMIR1 [1-20 µg/ratón, intraperitonealmente] 30 min antes de la exposición al alérgeno. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de experimentación animal de la Universidad hebrea de Jerusalén.

El modelo de peritonitis alérgica para probar el anticuerpo biespecífico implicó exponer intraperitonealmente los ratones, en el día 11, a 30 µg de albúmina de huevo en 300 µl de solución salina. 30 min antes de la exposición se inyectaron BsAb [LE1 o control, 3 µg en 100 µl de solución salina] contralateralmente. Los ratones se sacrificaron por isoflurano inhalado 45 min o 48 h tras la exposición para el análisis de mediadores o el recuento de eosinófilos, respectivamente. El líquido de lavado se evaluó para triptasa como se ha descrito. Para los recuentos de eosinófilos, el líquido de lavado se centrifugó, los números de células se normalizaron y las células se tiñeron usando anti-CCR3 de ratón conjugado con FITC y anti-CD48 de ratón conjugado con PE, y finalmente se analizaron por FACS.

La anafilaxis cutánea pasiva se generó como se ha descrito [Fung-Leung y col. (1996) J. Exp. Med. 183:49-56] con ligeras modificaciones. Brevemente, ratones BALB/C hembra sanos de 8-10 semanas de edad se inyectaron subcutáneamente con solución salina o anti-dinitrofenol de IgE [clon SPE7, 0,5 µg en 25 µl de solución salina] en 4 sitios dorsales. Simultáneamente se inyectaron BsAb [LE1 o control, 3 µg en 25 µl de solución salina] en dos de los sitios sensibilizados con IgE. Dos horas después, los ratones se expusieron intravenosamente a 1 mg de dinitrofenil-HSA más 0,75% de azul de Evan en 200 µl de solución salina. La anafilaxis cutánea se evaluó visualmente por la fuga de colorante de vasos sanguíneos a la piel.

Análisis estadístico

Los ensayos de activación, supervivencia y liberación de mediadores se realizaron por triplicado o cuadruplicado y siempre de al menos 3 donantes diferentes. Los datos se expresan como media ± D.E. Los datos se analizaron por ANOVA, seguido de prueba de la t para datos emparejados [suponiendo varianzas iguales] y a posteriori de Tukey-Kramer.

Ejemplo 1

CBMC expresan IRp60

Con el fin de investigar el patrón de expresión de receptores inhibidores sobre mastocitos humanos se empleó un enfoque de cribado usando un gran panel de mAb que reconocen diversos receptores inhibidores. Como se muestra en la Figura 1A, el análisis de FACS reveló que CBMC expresan altos niveles de IRp60, pero no LIR1/ILT2, LIR3/ILT5, p58.1, p58.2, p70, p140 o NKG2A/CD94 [n=10]. Uno de los diez donantes expresaron CD94, pero no NKG2A. Además, CBMC se tiñeron positivamente para FcγRIIB, un receptor inhibidor conocido [datos no mostrados].

Con el fin de evaluar si los mastocitos de tejido maduro expresan IRp60, HLMC se tiñeron para la expresión de IRp60. Como se muestra en la Figura 1B, HLMC también expresan niveles significativos de IRp60 [n=3]. A continuación, estas células se cribaron con diferentes mAbs que reconocen IRp60 [es decir, P192 y E59] para examinar si este patrón de expresión depende del anticuerpo. Ambos anticuerpos reconocieron niveles de IRp60 similares sobre la superficie de CBMC y HLMC [n=3, 5 respectivamente, datos no mostrados]. Como IRp60 fue el único receptor inhibidor expresado sobre CBMC [además de FcγRIIB], los datos de FACS se confirmaron con análisis de transferencia Western. Anti-IRp60 reconoce una proteína de ~ 60 kDa sobre mastocitos humanos, como se ha informado previamente [Cantoni C, y col. (1999) *id ibid.*] [datos no mostrados] [n=3].

Ejemplo 2

La MBP derivada de eosinófilos regula por disminución la expresión de IRp60 sobre CBMC

Los inventores investigaron a continuación la capacidad de diversos mediadores, encontrados en el medio inflamatorio alérgico, para modular la expresión de IRp60 sobre CBMC. Para esto, CBMC se cultivaron durante diversos momentos de tiempo en presencia de TNF-α, IL-3, IL-4, IgE monomérica, NGF y MBP derivada de eosinófilos. Con la excepción de MBP, ninguno de los mediadores influyó significativamente en la expresión de IRp60. Como se muestra en la Figura 2, la MBP indujo una disminución en el nivel de expresión de IRp60 empezando 12 horas desde que se alcanzó un efecto significativo después de 24 horas [n=3, p<0,01]. El efecto de MBP fue independiente del lote ya que la poli-L-arginina a un intervalo equimolar [25-100 nM] no afectó la expresión de IRp60.

Ejemplo 3

La reticulación de IRp60 inhibe la liberación dependiente de IgE de mediadores de CBMC

La expresión de IRp60 sobre la superficie de CBMC sugiere que sus respuestas pueden ser reguladas por este receptor. Para evaluar la capacidad de IRp60 para inhibir la desgranulación de CBMC, CBMC se sensibilizaron con IgE y se provocaron para desgranularse usando un anticuerpo anti-IgE o compuesto 48/80 en una placa recubierta con anti-IRp60. Como se muestra en las Figuras 3A y 3B, la reticulación de IRp60 inhibió fuerte y significativamente la liberación de β -hexosaminidasa mediada por IgE [$47,61 \pm 2,00\%$ frente al $11,71 \pm 1,12\%$ con anti-IRp60, $p < 0,001$], triptasa [$60,90 \pm 7,35\%$ frente al $14,11 \pm 1,45\%$ con anti-IRp60, $p < 0,001$] y IL-4 [$8,41 \pm 1,19$ pg/ml frente a $0,32 \pm 0,09$ pg/ml con anti-IRp60, $p < 0,001$]. De forma interesante, como se muestra en la Figura 3C, la reticulación de IRp60 no inhibió la liberación mediada por el compuesto 48/80 de β -hexosaminidasa, triptasa y IL-4 [datos no mostrados].

5 Ejemplo 4

La reticulación de IRp60 inhibe el flujo de entrada de $[Ca^{2+}]$ inducido por IgE

Una de las etapas iniciales en la activación de CBMC dependiente de Fc ϵ RI es el flujo de entrada de calcio intracelular. Por tanto, el efecto de la reticulación de IRp60 sobre el flujo de entrada de calcio se examinó usando el sensor de calcio Calcium Green-1AM. Como se muestra en la Figura 4, en el plazo de 10-20 s desde la adición de anti-IgE se observó un marcado aumento de $[Ca^{2+}]$. Este aumento se suprimió completamente en respuesta a la reticulación de IRp60 [$n=3$].

15 Ejemplo 5

La reticulación de IRp60 inhibe la supervivencia de CBMC mediada por SCF

El SCF es con mucho el factor de supervivencia más importante para mastocitos humanos. La señalización de SCF ejerce sus efectos tras la unión a c-kit e iniciando una cascada de señalización que implica la fosforilación de Src-
20 cinasas y fosfatidilinositol-3-cinasa. Con el fin de examinar la capacidad de IRp60 para interferir con la señalización del c-kit, CBMC se cultivaron en presencia o ausencia de SCF [100 ng/ml] en una placa recubierta con anti-IRp60 reticulada, seguido de análisis de FACS de células positivas para yoduro de propidio [PI]. Como se muestra en la
25 Figura 5, la reticulación de IRp60 inhibió significativamente la supervivencia de mastocitos en ambos momentos de tiempo [$10,02 \pm 0,79\%$ y $37,68 \pm 0,69\%$ de células PI+ frente al $1,83 \pm 0,38\%$ y $3,65 \pm 0,33\%$ de células PI+, $p < 0,001$ a 24 h y 48 h, respectivamente] [$n=3$].

Ejemplo 6

La IRp60 experimenta fosforilación de tirosina y recluta SHP-1 y SHIP-1

Como se ha mencionado anteriormente, el efecto inhibitorio de IRp60 sobre células NK está mediado por el reclutamiento de SHP-1 y SHP-2. Con el fin de establecer el mecanismo de la actividad inhibitoria de IRp60 sobre
30 mastocitos humanos, CBMC se trataron con ortovanadato de sodio o alternativamente se reticularon, precipitaron y transfirieron para fosfotirosina, SHP-1, -2 y SHIP-1. Como se muestra en la Figura 6A, tras el pretratamiento con ortovanadato y la reticulación con IRp60, la IRp60 experimenta fosforilación de tirosina. Además, como se demuestra en la Figura 6B, la IRp60 co-precipitó con SHP-1 y SHIP-1, pero no con SHP-2 [$n=3$].

35 Ejemplo 7

La IRp60 regula la activación de mastocitos y la consiguiente respuesta inflamatoria en un modelo de ratón con peritonitis alérgica

Con el fin de distinguir si IRp60 tiene una función en la regulación de la activación de mastocitos *in vivo* se usó un modelo murino de inflamación alérgica. A diferencia de los protocolos de asma experimentales en los que la función de los mastocitos es poco clara, la función de los mastocitos en el modelo de peritonitis alérgica murina se ha establecido bien [Zuany-Amorim (1994) *id ibíd.*]. El análisis bioinformático reveló que LMIR1 es el homólogo murino de IRp60 [datos no mostrados]. Por tanto, los inventores examinaron si los mastocitos murinos expresaban LMIR1. Como se muestra en la Figura 7, tanto BMBC como los mastocitos peritoneales expresan niveles significativos de LAIR1. Posteriormente, el efecto regulador de LMIR1 se examinó añadiendo un anticuerpo neutralizante que reconoce este receptor. Como se muestra en la Figura 8A, los ratones pretratados con anticuerpo monoclonal anti-LMIR1 a concentraciones micromolares mostraron activación de mastocitos potenciada en respuesta a la exposición a alérgeno y el aumento de los niveles de triptasa y β -hexosaminidasa se midió en el líquido de lavado peritoneal. Además, como se muestra en la Figura 8B, la inflamación eosinofílica resultante aumentó en el lavado peritoneal, y la inflamación eosinofílica total aumentó en comparación con los ratones tratados con albúmina de huevo y albúmina de huevo con grupos de control de isotipo.

50 Ejemplo 8

La IRp60 se expresa sobre eosinófilos humanos

Con el fin de investigar el patrón de expresión de receptores inhibidores sobre mastocitos humanos se empleó un

enfoque de cribado usando un gran panel de mAb que reconoce diversos receptores inhibidores. Como se muestra en la Figura 9A, el análisis de FACS reveló que los eosinófilos expresan altos niveles de IRp60, p140, LIR3/ILT5 y FcγRIIB, pero no LIR1/ILT2, LIR3/ILT5, p58.1, p58.2, p70 o NKG2A/CD94 (n=10). De forma interesante, sólo el 30% de los eosinófilos analizados expresó p140.

- 5 Con el fin de evaluar si los eosinófilos de tejido maduro expresan IRp60, eosinófilos de pólipos nasales se tiñeron para la expresión de IRp60. Como se muestra en la Fig. 9B, eosinófilos de pólipos nasales también expresan niveles significativos de IRp60 (n=3). Estas células se cribaron a continuación con diferentes mAb que reconocían IRp60 (es decir, P192 y E59) para examinar si este patrón de expresión dependía del anticuerpo. Ambos anticuerpos reconocieron niveles similares de IRp60 sobre la superficie de eosinófilos de la sangre periférica y eosinófilos de pólipos nasales (n=3 y 5, respectivamente) (datos no mostrados).

Ejemplo 9

La IRp60 inhibe la supervivencia mediada por IL-5 y GM-CSF de eosinófilos humanos

15 IL-5, GM-CSF y IL-3 son importantes citocinas en la biología de los eosinófilos y se llaman frecuentemente "factores de supervivencia de eosinófilos". En seres humanos, tras la unión a una cadena α de baja afinidad, las tres citocinas reclutan una cadena β común que ejerce sus rutas de señalización. Esta ruta de señalización depende de la fosforilación de tirosina y el reclutamiento de las cinasas de la familia Src tales como Lyn y Syk. Por tanto, los inventores tienen como objetivo evaluar si la IRp60 podría modular los efectos antiapoptóticos que transducen estas citocinas. Para esto, eosinófilos recientemente aislados se reticularon con anti-IRp60 o control del mismo isotipo y anticuerpo de oveja anti-ratón. Después se añadió IL-5 o GM-CSF a diferentes concentraciones durante diversos momentos de tiempo. Como se muestra en la Figura 10A y 10B, la IRp60 inhibió el efecto antiapoptótico de GM-CSF y IL-5 (datos no mostrados). Por ejemplo, a las 18 h de incubación y a 50 ng/ml de GM-CSF, el porcentaje de células apoptóticas en el grupo sin tratar fue el $23,16 \pm 0,65\%$ mientras que en las células tratadas con GM-CSF fue sólo el $1,25 \pm 0,23\%$. El $15,62 \pm 3,9\%$ de las células tratadas con reticulación anti-IRp60 y GM-CSF fueron apoptóticas. Este efecto también se observó a las 36 h cuando el $13,85 \pm 0,6\%$ de las células tratadas con GM-CSF fueron apoptóticas y el $36,7 \pm 0,45\%$ de las células tratadas con IRp60 fueron apoptóticas. De forma interesante, la capacidad de IRp60 para inhibir el efecto antiapoptótico de IL-5 y GM-CSF se potenció a medida que las concentraciones aumentaron 5-50 ng/ml en ambos momentos de tiempo ($6,7 \pm 1,7\%$, $9,45 \pm 1,95\%$, $15,6 \pm 3,9\%$, 5, 20, 50 ng/ml de GM-CSF, respectivamente, 18 h, $19,6 \pm 0,21\%$, $27,5 \pm 0,63\%$, $36,7 \pm 0,45\%$, 5, 20, 50 ng/ml de GM-CSF, respectivamente, 36 h).

Ejemplo 10

La IRp60 inhibe la activación mediada por IL-5 y GM-CSF de eosinófilos humanos

IL-5, GM-CSF y IL-3 también pueden activar eosinófilos. Por tanto, los inventores examinaron si la reticulación de IRp60 también inhibiría el efecto activador. Como se muestra en la Figura 11A y 11B, la reticulación de IRp60 bloqueó completamente la liberación mediada por GM-CSF de IL-8 IL-1b, IL-4 y IFN- γ .

Ejemplo 11

La IRp60 inhibe la quimiotaxia dependiente de eotaxina de eosinófilos humanos

Uno de los factores más importantes que regula el tráfico de eosinófilos en el tejido inflamado es la eotaxina. Aunque no se sabe mucho sobre la señalización de la eotaxina, varios informes demuestran que la eotaxina induce fosforilación de tirosina y reclutamiento de cinasas de la familia Src tales como Hck y Fgr. Por tanto, los inventores evaluaron si la IRp60 podría bloquear la activación de eosinófilos dependiente de eotaxina. Se comprobaron dos parámetros, la quimiotaxia y el cambio de forma.

Para el ensayo de quimiotaxia (Fig. 12A), 3×10^5 eosinófilos se incubaron con anti-IRp60, anti-CCR3 o isotipo (todos a 5 $\mu\text{g/ml}$, 30 min sobre hielo) seguido de anticuerpo de oveja anti-ratón (25 $\mu\text{g/ml}$, 30 min sobre hielo) y se lavaron exhaustivamente. Las células se colocaron en la cámara superior de una placa Transwell (filtro de policarbonato, poros de 3 μm , Corning Costar-Corp) en volúmenes de 100 μl de medio y la eotaxina humana (en HBSS más 0,5% de BSA) se colocó en la cámara inferior a 0, 1, 10 y 100 ng/ml. Después de la incubación, las células en la cámara inferior se contaron por medio de citometría de flujo: se obtuvieron recuentos relativos de células adquiriendo acontecimientos durante 60 segundos.

Para el ensayo de cambio de forma (Fig 12B), 3×10^5 eosinófilos se incubaron con anti-IRp60, anti-CCR3 o isotipo (todos a 5 $\mu\text{g/ml}$, 30 min sobre hielo) seguido de anticuerpo de oveja anti-ratón (25 $\mu\text{g/ml}$, 30 min sobre hielo) y se lavaron exhaustivamente. El cambio de forma de los eosinófilos inducido por eotaxina se evaluó usando autofluorescencia dependiente/dispersión directa (FSC). Este ensayo usa autofluorescencia diferencial para identificar tipos de leucocitos y cambios en FSC para medir el cambio de forma en respuesta al agonista. Brevemente, se aislaron granulocitos por medio de sedimentación con dextrano, centrifugación en gradiente con Percoll y lisis de glóbulos rojos hipotónicos y se preincubaron durante 30 minutos a 37°C en tampón de cambio de forma (PBS con 0,9 mmol/l de CaCl_2 , 0,5 mmol/l de MgCl_2 , 10 mmol/l de glucosa, 10 mmol/l de HEPES y 0,1% de

BSA). Las células se incubaron a 37°C en un baño de agua con agitación y la reacción se detuvo colocando las células sobre hielo y fijándolas con 600 µl de 4% de paraformaldehído frío en tampón de cambio de forma. Las células se analizaron adicionalmente por medio de citometría de flujo en el citómetro de flujo FACScalibur (Beckton Dickinson). Los eosinófilos se distinguieron por su alta autofluorescencia en el canal de FL2 (585 nm) y se adquirió el FSC de 5000 células. El cambio en porcentaje en la forma de las células se calculó del siguiente modo: $100 \times \frac{\{FSC(\text{quimiocina}) - FSC(\text{medio})\}}{FSC(\text{medio})}$. El pretratamiento con inhibidores no alteró significativamente el FSC basal.

Como se muestra en las Figuras 12A y 12B, la reticulación de IRp60 inhibió las respuestas quimiotácticas de eosinófilos que fueron provocadas por eotaxina (Fig. 12A). Además, la IRp60 pudo bloquear completamente el cambio de forma inducido por eotaxina (Fig. 12B).

Ejemplo 12

Generación de un BsAb IgE-IRp60

Con el fin de monitorizar cada etapa del procedimiento de generación de BsAb, tras cada filtración en gel se tomaron muestras para evaluar la posible pérdida de material. Las muestras se ejecutaron sobre SDS-PAGE para la evaluación de los fragmentos de Fab' reactivos antes del acoplamiento, y el producto de F(ab')₂ después del acoplamiento. Como se muestra en la Figura 13A, la SDS-PAGE nativa muestra uno de los reactivos de Fab' a ~50 kDa antes del acoplamiento. Después del acoplamiento, la SDS-PAGE reductora muestra el BsAb separado en dos fragmentos de la cadena pesada de ~37 kDa y dos cadenas ligeras completas de ~25 kDa, próximas a dos controles de tamaño de IgG. El reconocimiento biespecífico de IE1 se evaluó por FACS. Como se muestra en la Figura 13B, IE1 reconoció células RBL sensibilizadas con IgE similarmente a anti-IgE humana, pero no anti-IRp60 humana, mientras que reconoció mastocitos humanos frescos similarmente a anti-IRp60 humana, pero no anti-IgE humana. El rendimiento nominal promedio del procedimiento de generación fue aproximadamente el 40%.

Ejemplo 13

Inhibición de la desgranulación de mastocitos *in vitro*

Para evaluar el potencial de IE1 para inhibir la activación de mastocitos, los mastocitos humanos sensibilizados con IgE se incubaron con IE1 o el control del mismo isotipo, y luego se activaron usando anticuerpo anti-IgE. Como se muestra en la Figura 14, IE1 inhibió casi completamente la liberación de β-hexosaminidasa de los mastocitos.

Ejemplo 14

Inhibición de respuestas alérgicas *in vivo*

Con el fin de determinar si el efecto observado en mastocitos humanos aislados *in vitro* también podría observarse *in vivo*, se generó un BsAb llamado LE1 que reconoce IgE murina y LMIR1, el homólogo murino de IRp60. LE1 o su control del mismo isotipo se administraron adicionalmente a animales en dos modelos de respuesta alérgica. En peritonitis alérgica, como se muestra en la Figura 15, LE1 inhibió completamente la liberación de triptasa de la desgranulación de mastocitos peritoneales tras la exposición al alérgeno. Además, como se muestra en la Figura 16A y 16B, los recuentos de eosinófilos disminuyeron espectacularmente en los grupos tratados con LE1 antes de la exposición al alérgeno, que significa que se reclutaron menos eosinófilos al peritoneo por los mastocitos. En anafilaxis cutánea pasiva, LE1 inhibió completamente la fuga de colorante que se derivaba de la liberación de histamina y leucotrieno de mastocitos de la piel (Figs. 17A-17B).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico o cualquier fragmento de unión del mismo que comprende:

(i) un primer componente de reconocimiento diana que se une específicamente a la IRp60 del receptor inhibitor; y

5 (ii) un segundo componente de reconocimiento diana que se une específicamente a un marcador específico para un mastocito, un eosinófilo y/o un basófilo, en el que dicho marcador es un activador o un receptor cuya ruta de transducción de señales se inhibe por la activación de dicho receptor inhibitor y en el que dicho
 10 marcador se selecciona del grupo que consiste en inmunoglobulinas, receptores de Fc, receptores de citocinas, receptores de factores de crecimiento, moléculas de adhesión, receptores de la superfamilia de las Ig, receptores de quimiocinas, receptor de mediadores inflamatorios, receptores de hormonas, receptores de factores del complemento, receptores activados por proteasa y enzimas

y en el que dicha IRp60 del receptor inhibitor y dicho marcador están presentes en una única célula.

2. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que dicho primer y segundo componentes de reconocimiento diana están ligados mediante uno cualquiera de un reticulador, un compuesto ligador, un vehículo,
 15 un espaciador sintético, un sustrato de inmovilización y un motivo (Gly₄Ser)₃ basado en la región flexible.

3. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que dicho primer y segundo componentes de reconocimiento diana están reticulados.

4. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1-3, en el que dicho componente de reconocimiento se selecciona de uno cualquiera de un anticuerpo que se produce naturalmente, sintético o recombinante, Fv monocatenario
 20 (scFv), scFv bifuncional, diacuerpo, unidad F(ab), unidad F(ab'), conjugado de F(ab') biespecífico, anticuerpo bifuncional químicamente reticulado, anticuerpo lineal, fragmento de unión a antígeno F(ab')₂ de un anticuerpo, o cualquier fragmento funcional los mismos.

5. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1-4, en el que dicho componente de reconocimiento es una unidad F(ab').

25 6. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1-5, en el que dicho marcador es uno de IgE, cKIT, IL-5R, CCR3 y FcεRI.

7. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que dicho marcador es IgE.

8. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que dicho marcador es c-KIT.

9. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que dicho marcador es FcεRI.

30 10. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que dicho marcador es CCR3.

11. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que dicho marcador es IL-5R.

12. Una composición farmacéutica que comprende como agente activo al menos uno del complejo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

35 13. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además tampones, aditivos, estabilizadores, diluyentes y/o excipientes.

14. Uso de al menos uno de los anticuerpos biespecíficos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cualquier enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en: alergia, asma alérgico, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica y eczema atópico, trastornos alérgicos y respuestas a diversos alérgenos, anafilaxia sistémica, mastocitosis sistémica, morfea/urticaria pigmentosa, leucemia de mastocitos, aterosclerosis, rechazo de injerto, esclerosis múltiple, enfermedades pulmonares fibróticas, neurofibromatosis, queloides, esclerodermia, artritis reumatoide, osteoartritis, gota aguda, penfigoide cicatricial ocular, enfermedad de Crohn, adhesiones peritoneales, enfermedad crónica de injerto frente a huésped (GVHD), síndrome de eosinofilia-mialgia, asma bronquial, poliposis nasal, granulomatosis de Wegener, enfermedades pulmonares intersticiales y otras enfermedades pulmonares, neumonía eosinofílica crónica,
 40 neumonitis por hipersensibilidad, aspergilosis broncopulmonar alérgica, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedades neoplásicas y mieloproliferativas, linfomas de linfocitos T y enfermedad de Hodgkin.

15. El uso de la reivindicación 14, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en asma bronquial extrínseco, rinitis alérgica, dermatitis oncocercuiana, dermatitis atópica, poliposis nasal, nódulos, eosinofilia, reumatismo, dermatitis e hinchazón (NERDS), enfermedades granulomatosas vasculíticas, vasculitis temporal, síndrome de Churg-Strauss, poliarteritis, granulomatosis de Wegener, esclerosis múltiple, rechazo de injerto, asma bronquial, enfermedades pulmonares intersticiales y otras enfermedades pulmonares, efusiones pleurales
 50

5 eosinofílicas, infiltrados eosinofílicos pulmonares transitorios (Löffler), histiocitosis, neumonía eosinofílica crónica, neumonitis por hipersensibilidad, aspergilosis broncopulmonar alérgica, fibrosis pulmonar idiopática, eosinofilia tóxica, enfermedad del araño de gato, tuberculosis afebril, neumonía por clamidia en la infancia, enfermedades neoplásicas y mieloproliferativas, carcinoma broncogénico, síndrome hipereosinofílico, linfomas de linfocitos T y enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Crohn, queratoconjuntivitis primaveral, nevo por conjuntivitis inflamada juvenil, enfermedad de Kimura, enfermedad de Gleich.

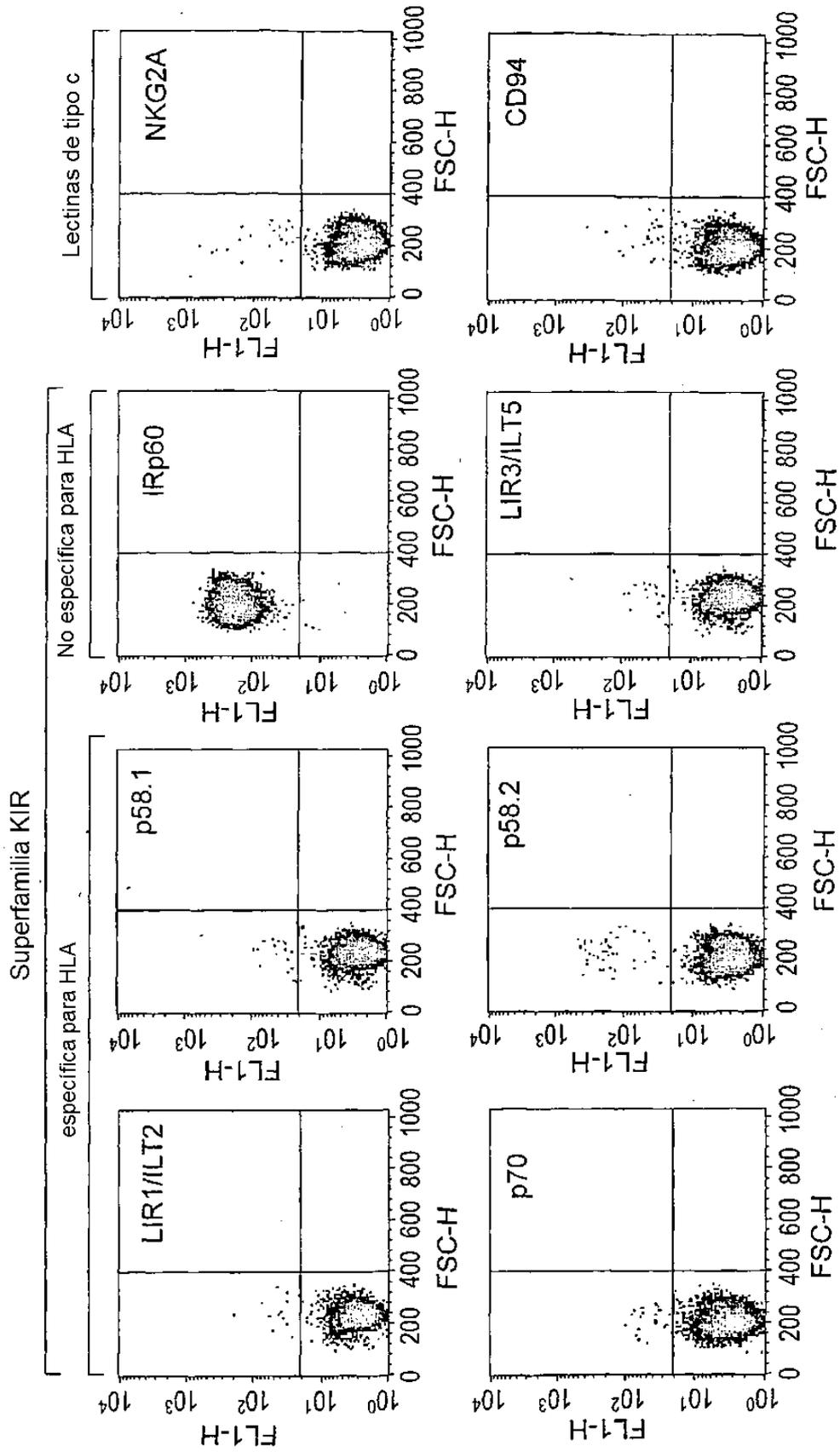


Fig. 1

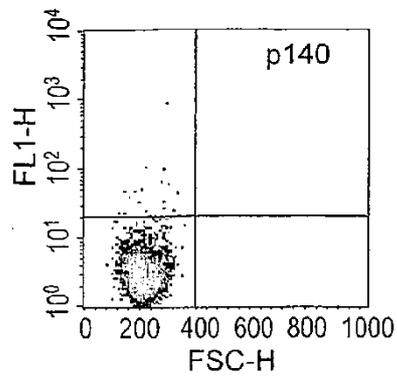


Fig. 1 (cont.)

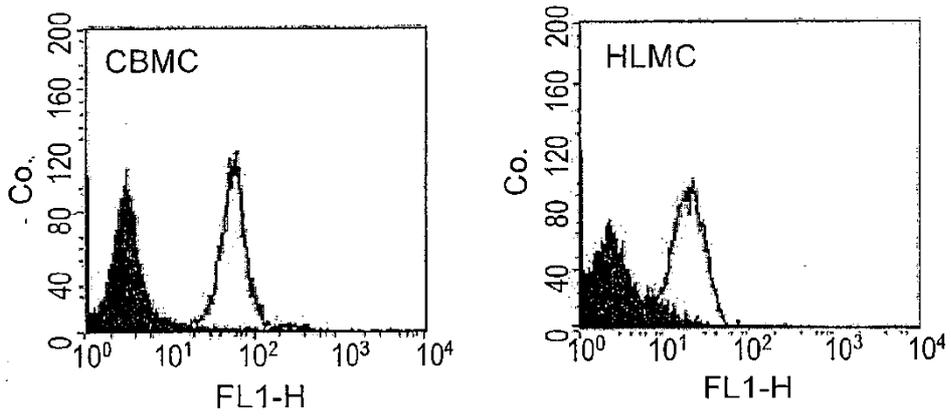


Fig. 2A

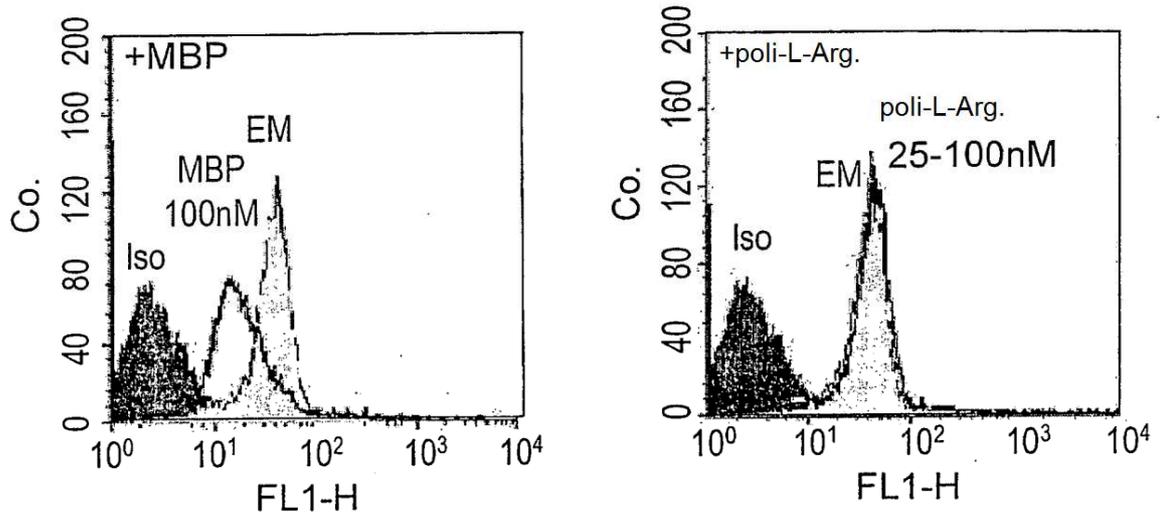


Fig. 2B

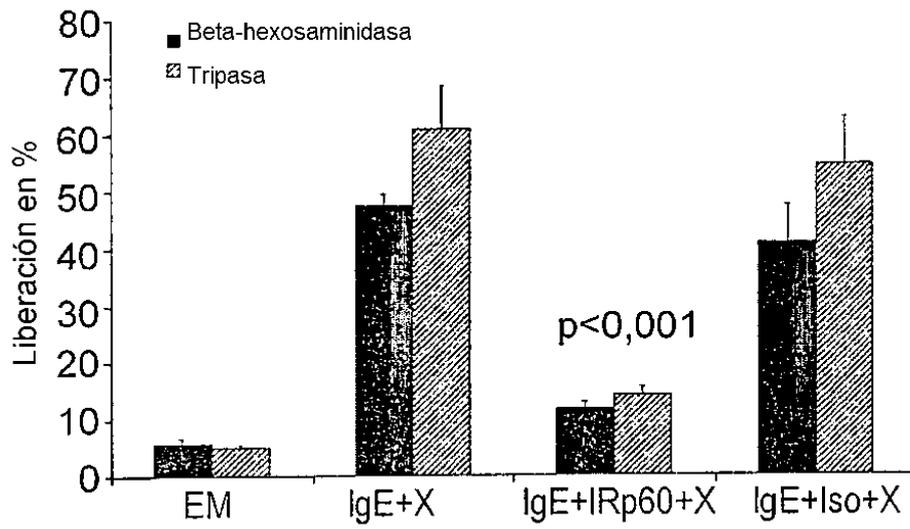


Fig. 3A

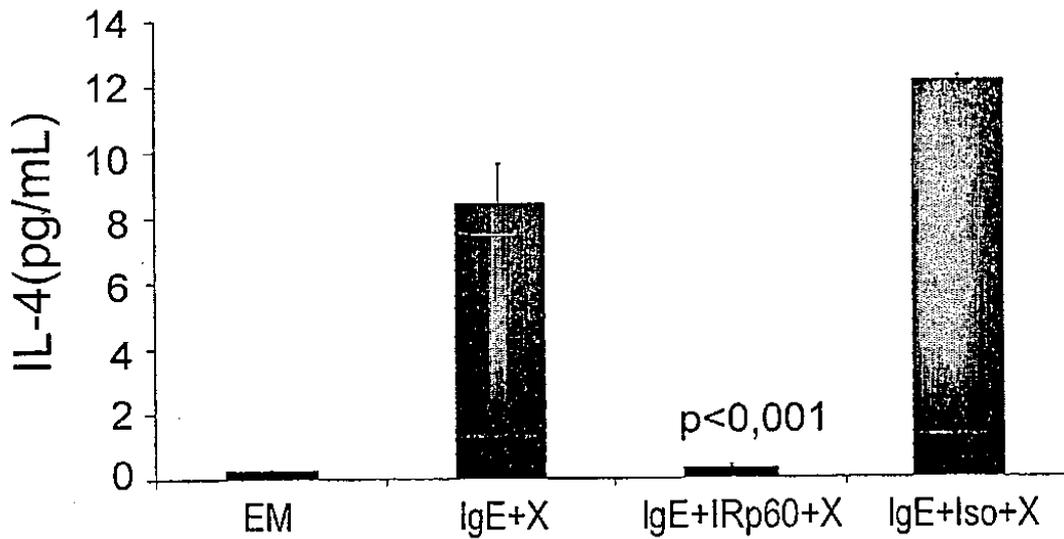


Fig. 3B

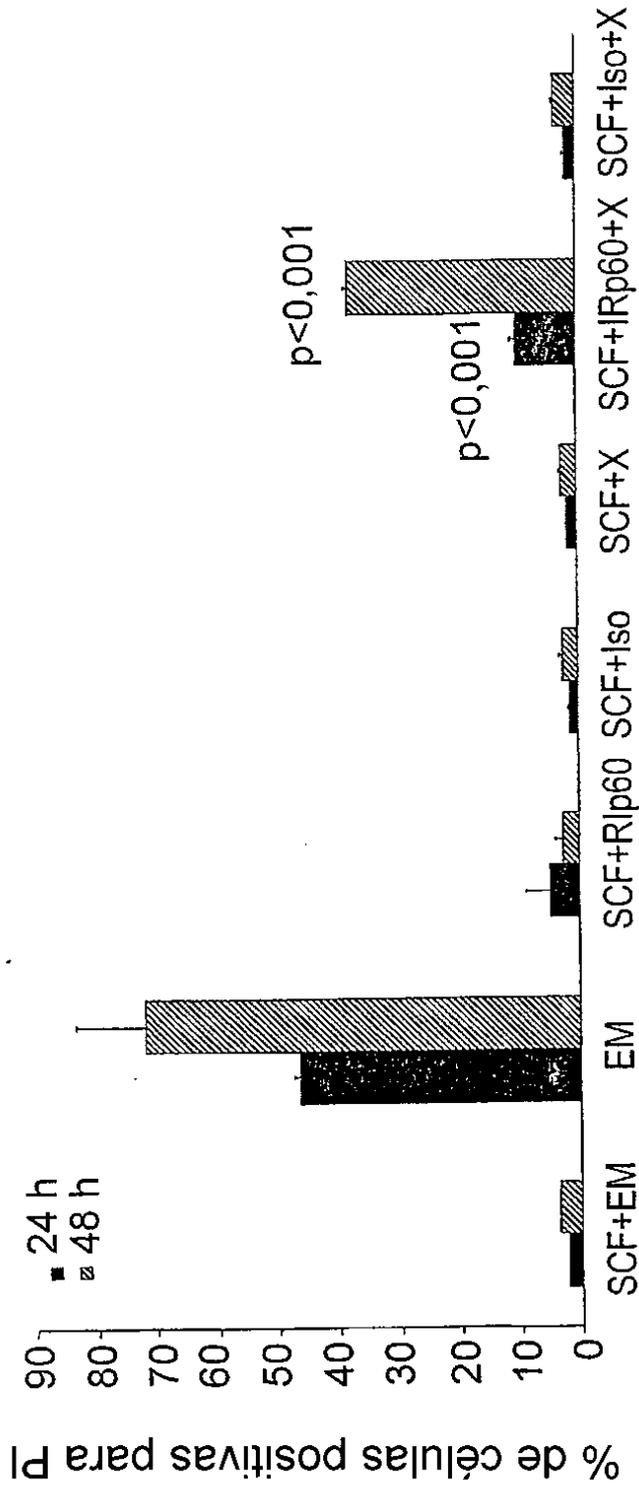
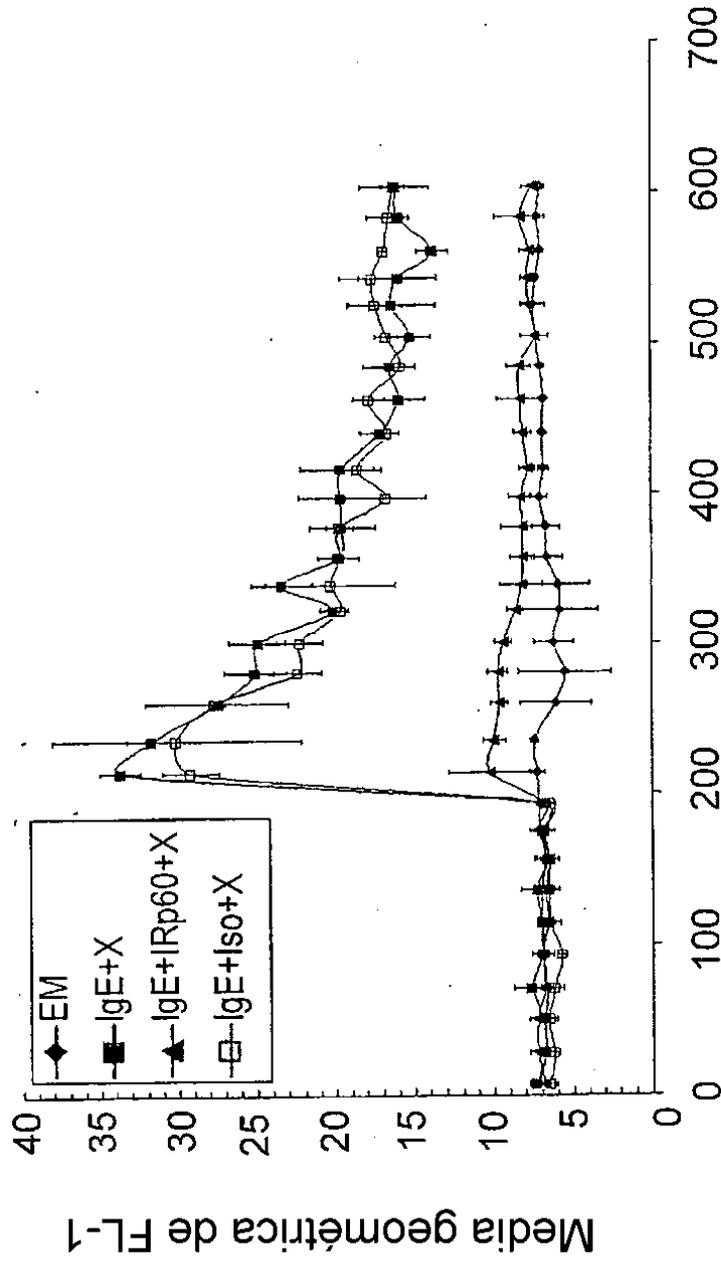


Fig. 4



T. [X500 millis]

Fig. 5

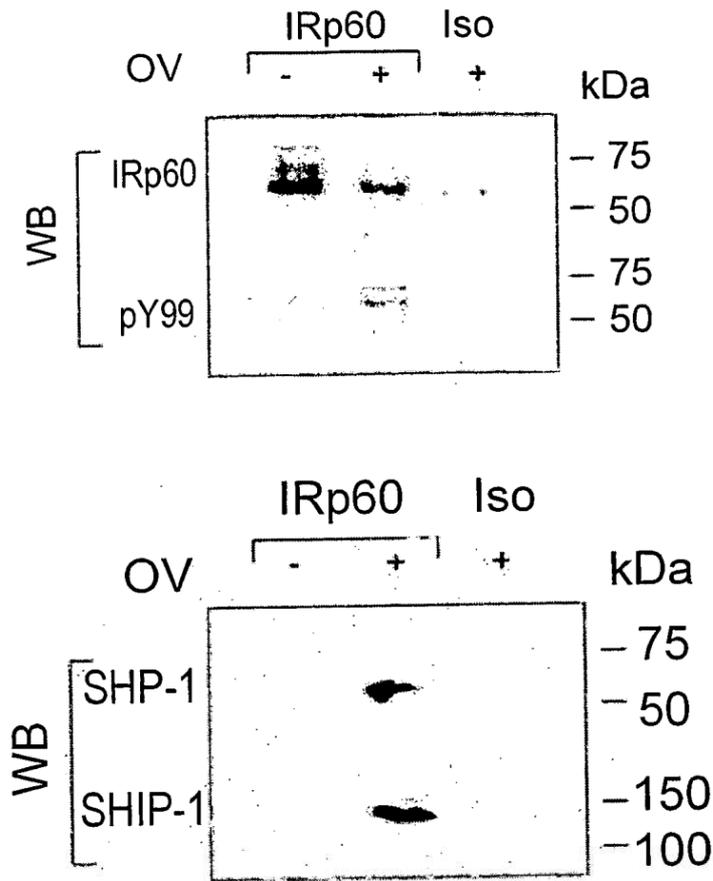


Fig. 6A

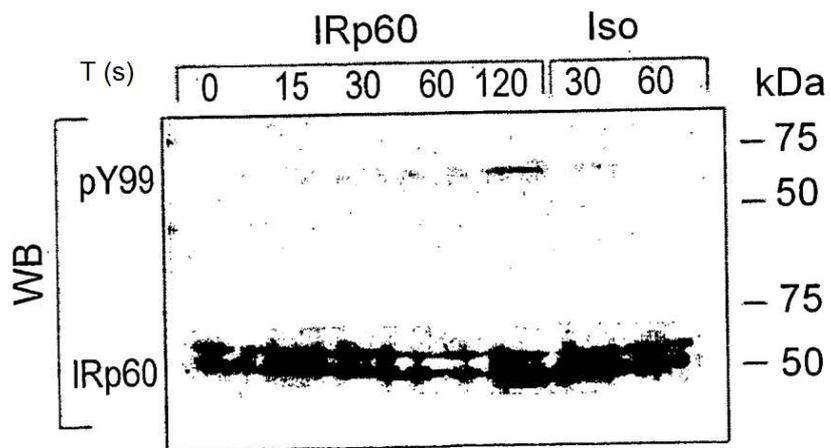


Fig. 6B

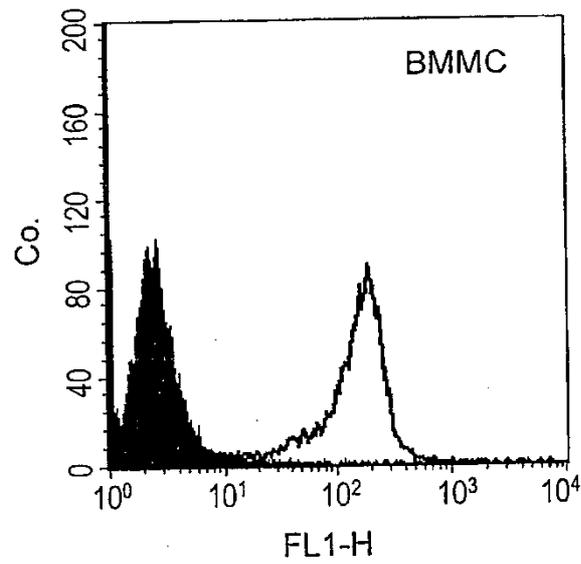
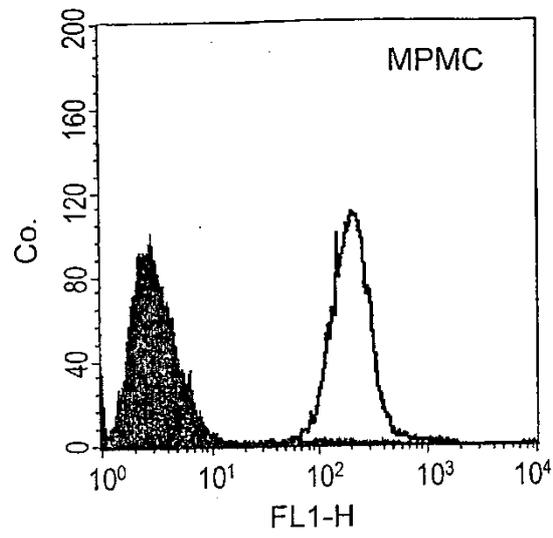


Fig. 7

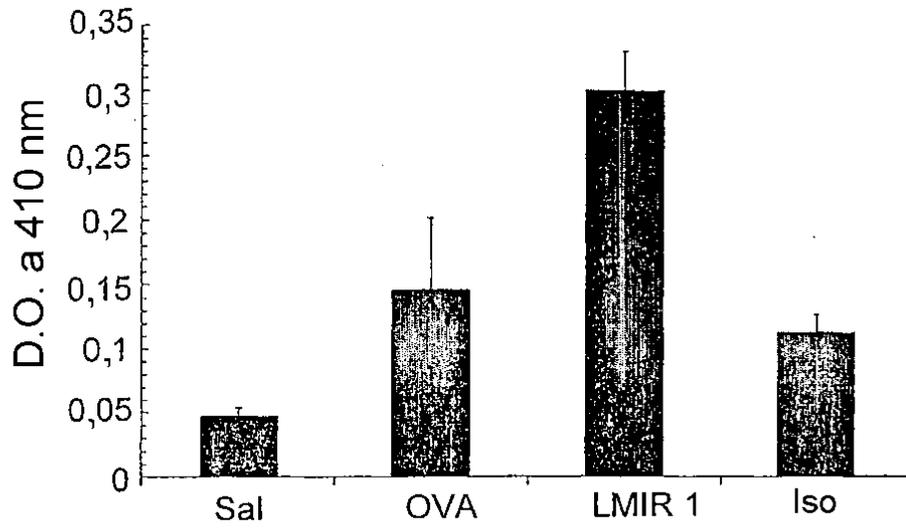


Fig. 8A

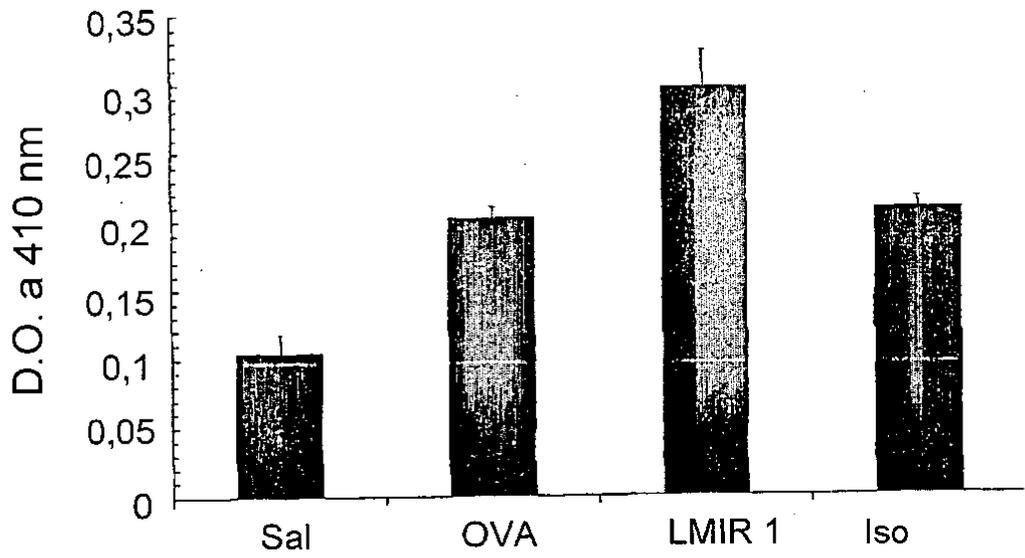


Fig. 8B

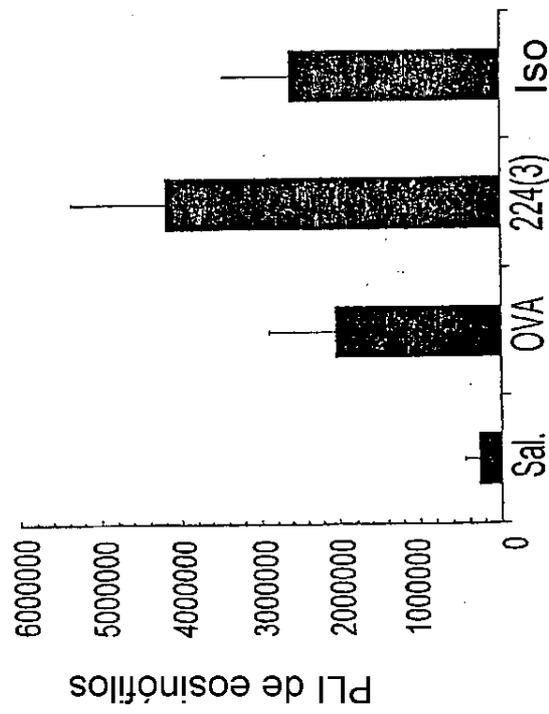


Fig. 8C

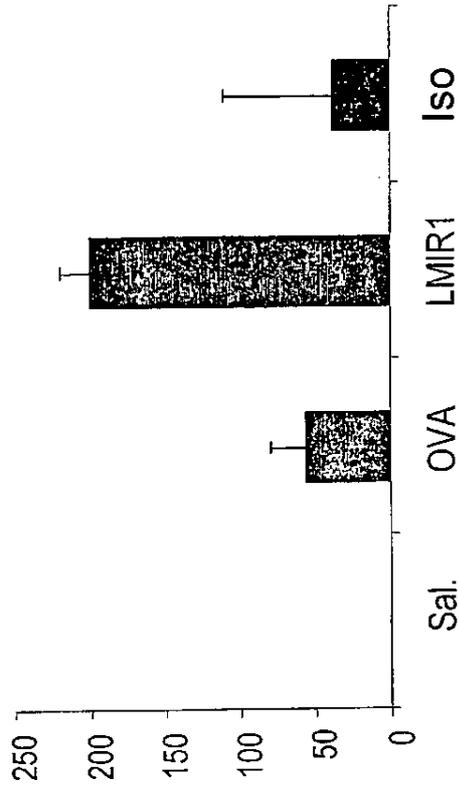


Fig. 8D

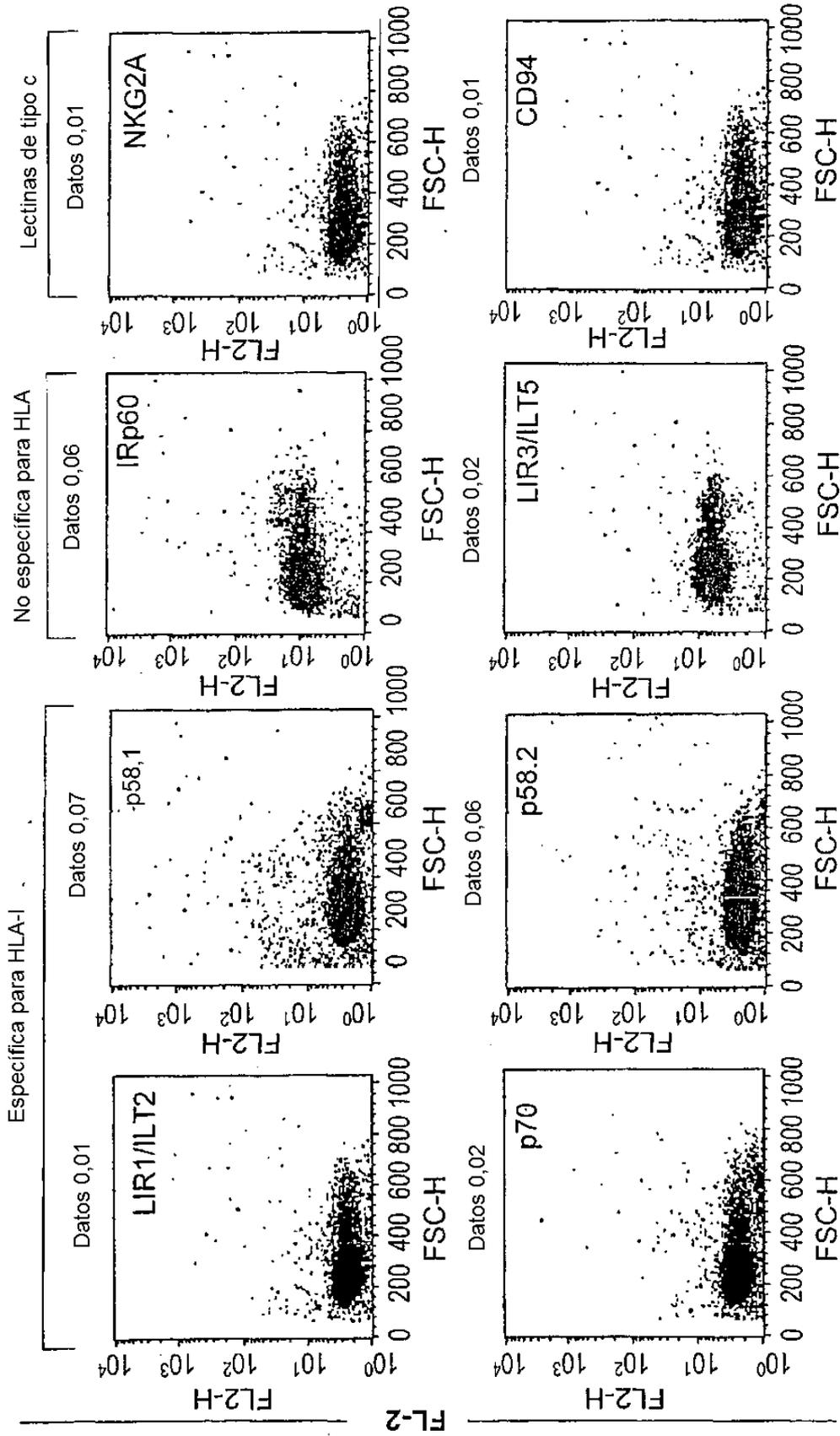


Fig. 9A

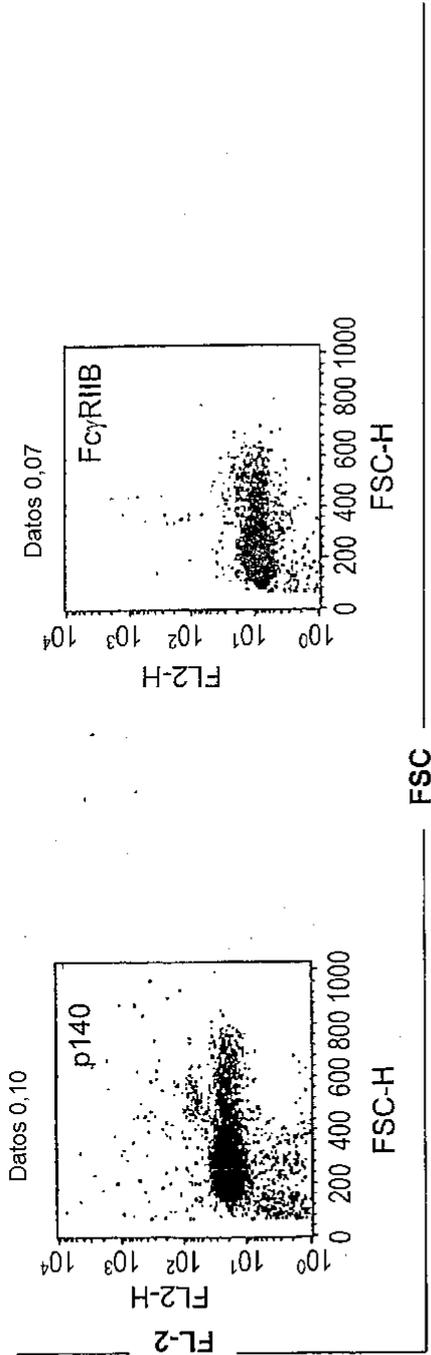


Fig. 9A (cont.)

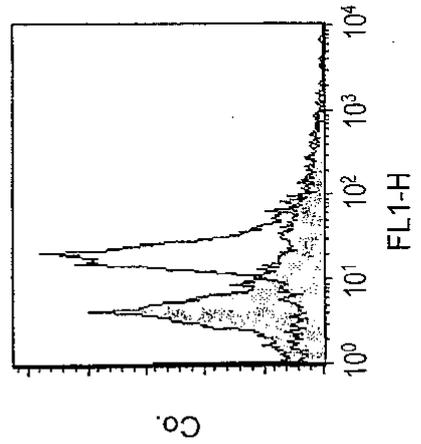


Fig. 9B

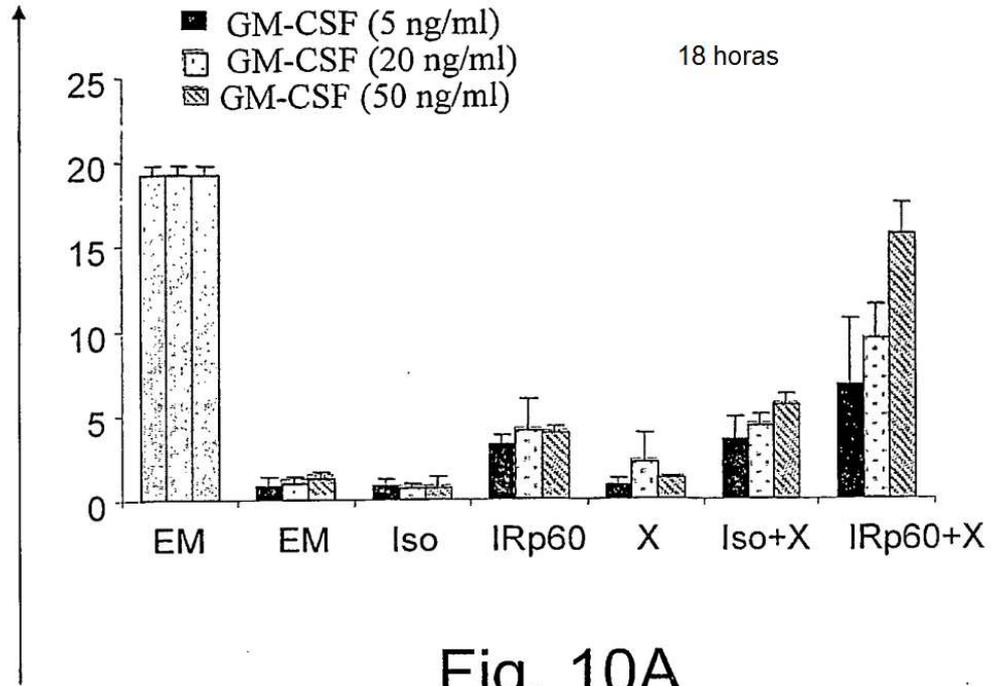


Fig. 10A

% de células apoptósicas

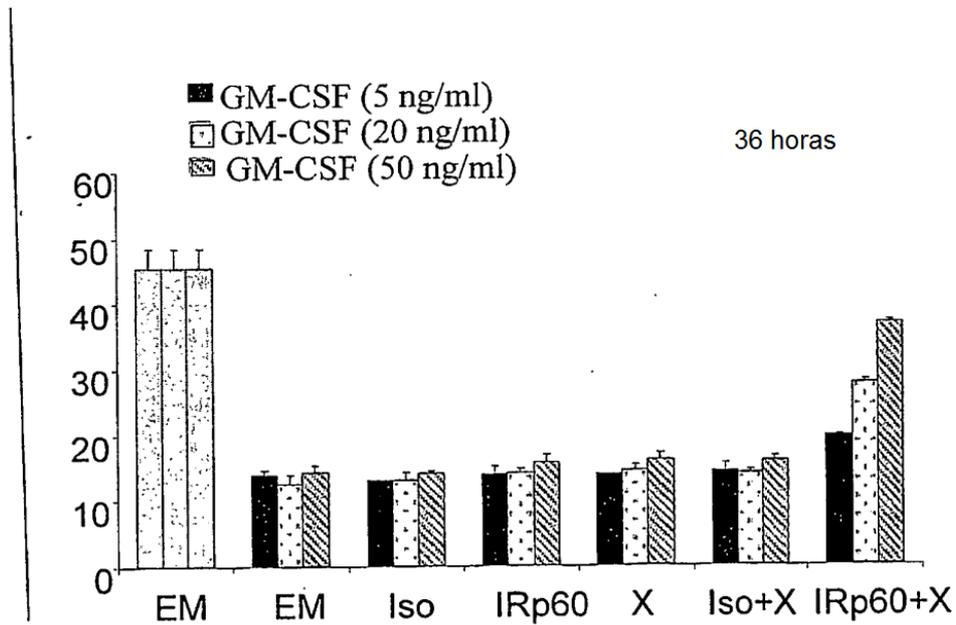


Fig. 10B

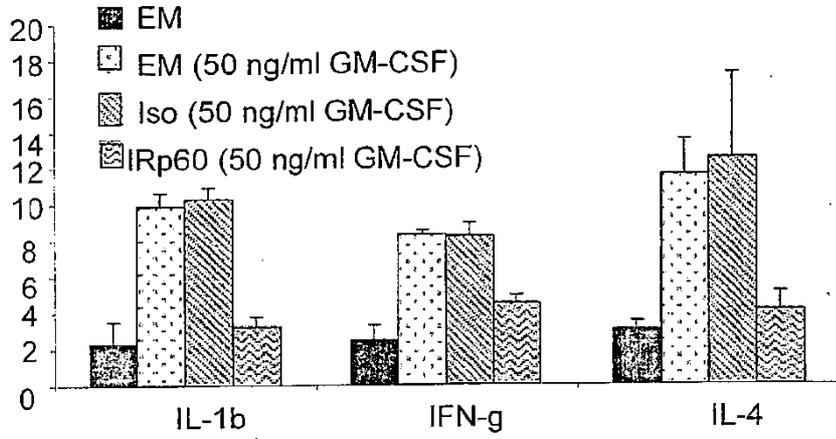


Fig. 11A

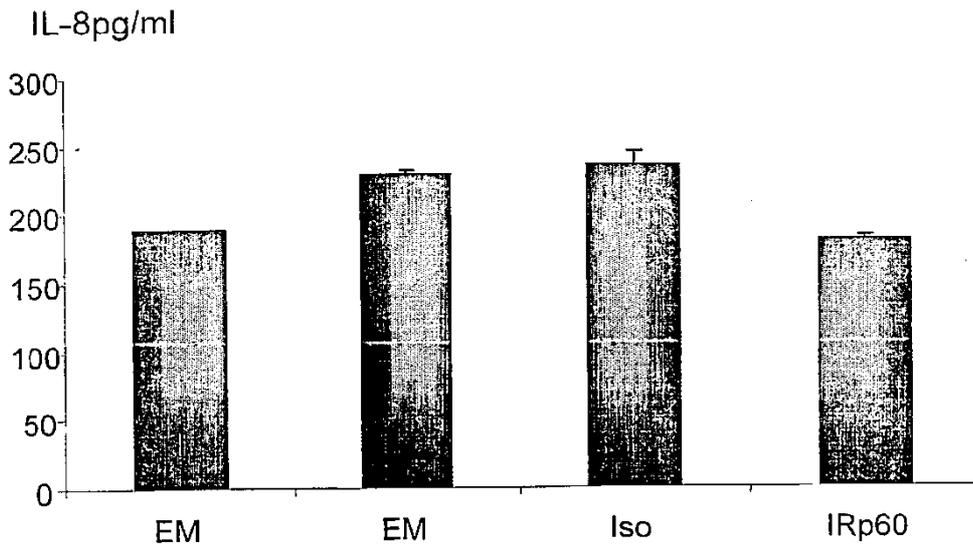


Fig. 11B

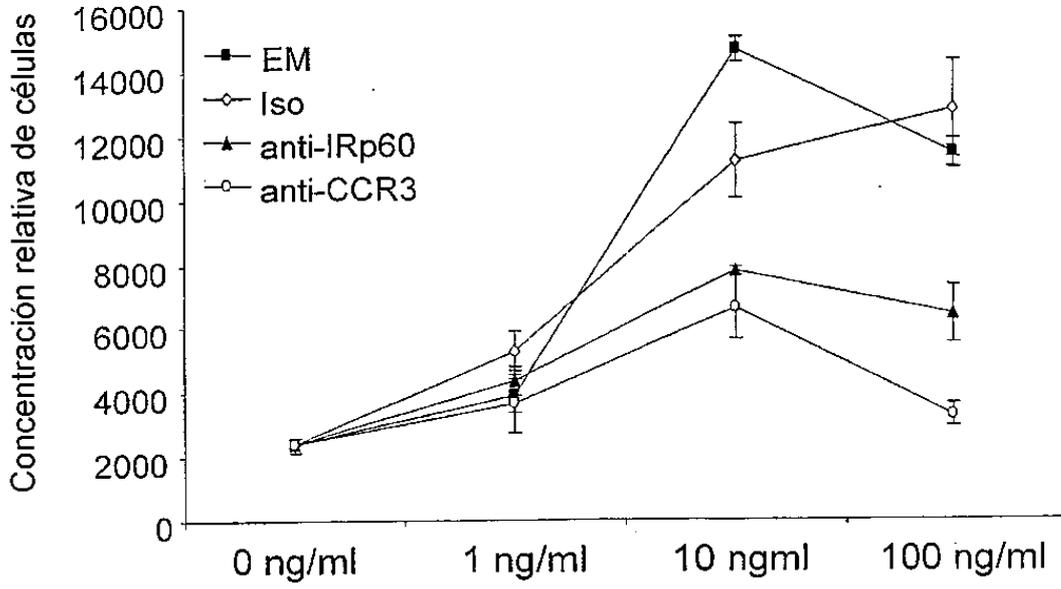


Fig. 12A

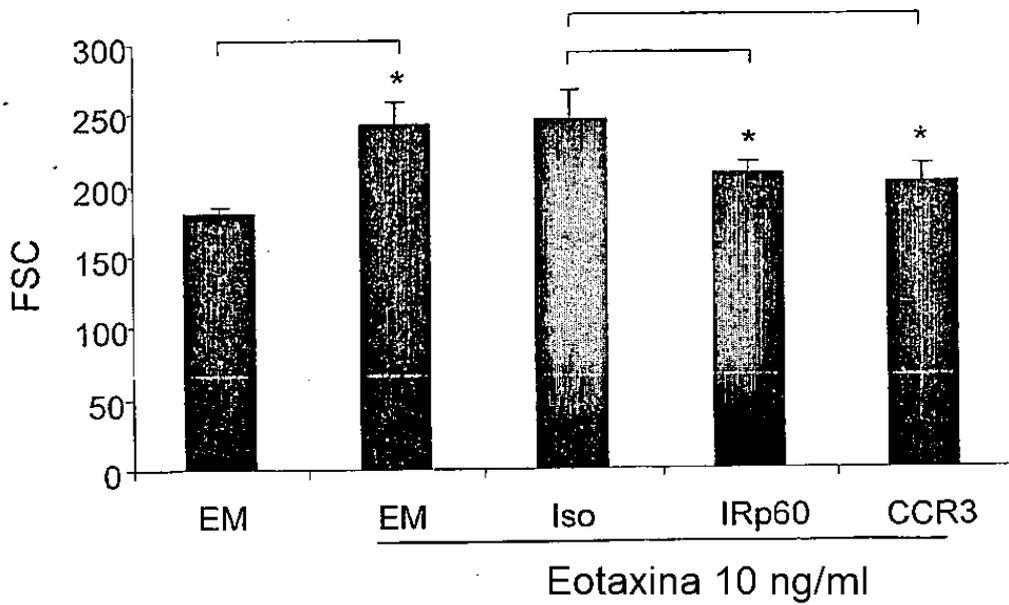


Fig. 12B

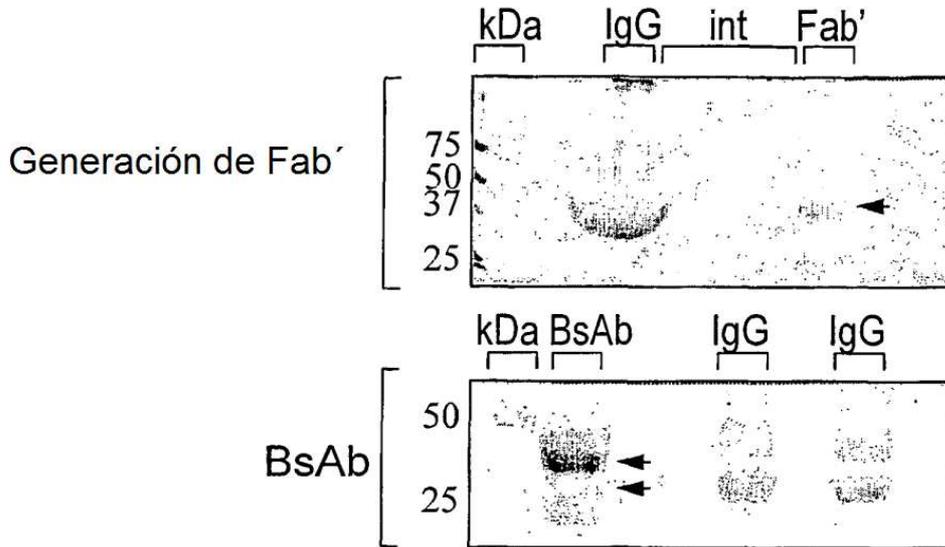


Fig. 13A

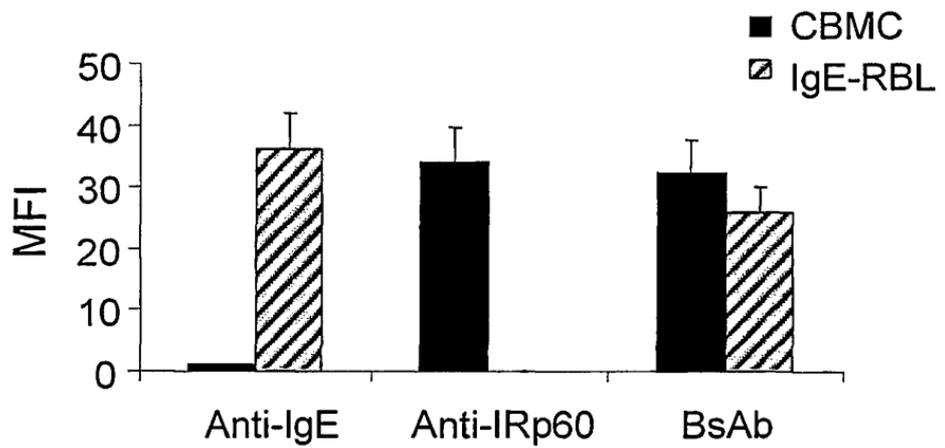


Fig. 13B

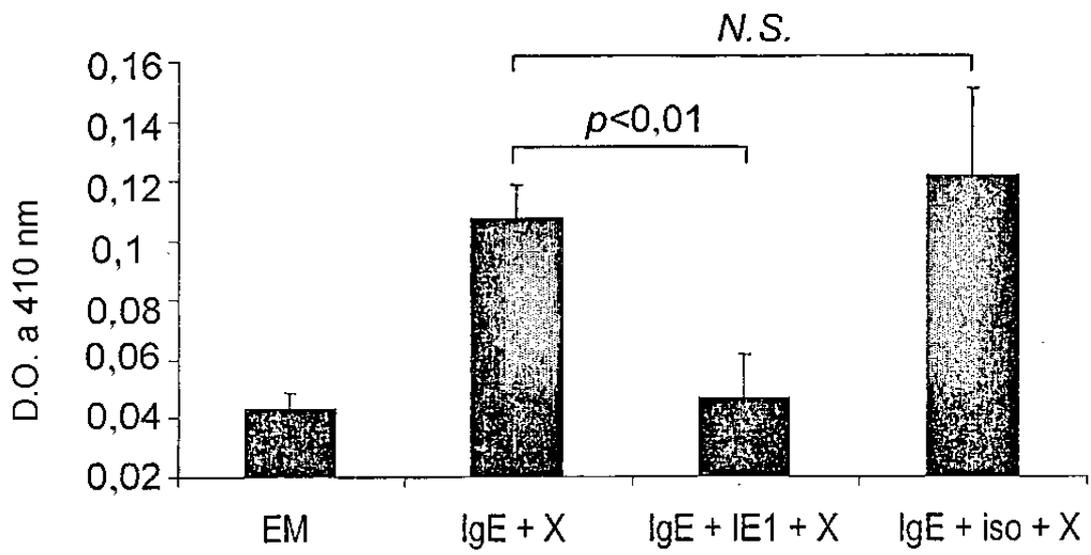


Fig. 14

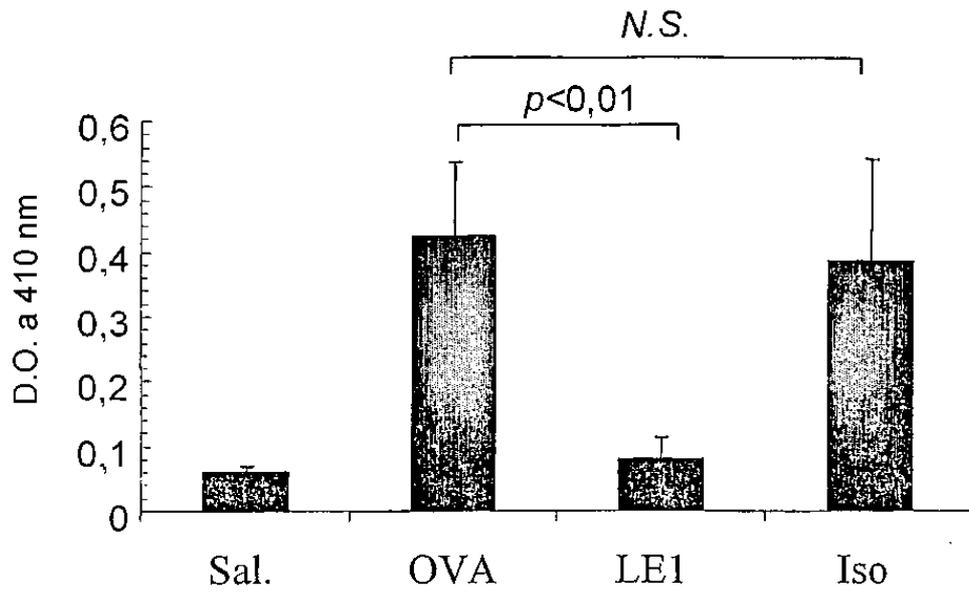


Fig. 15A

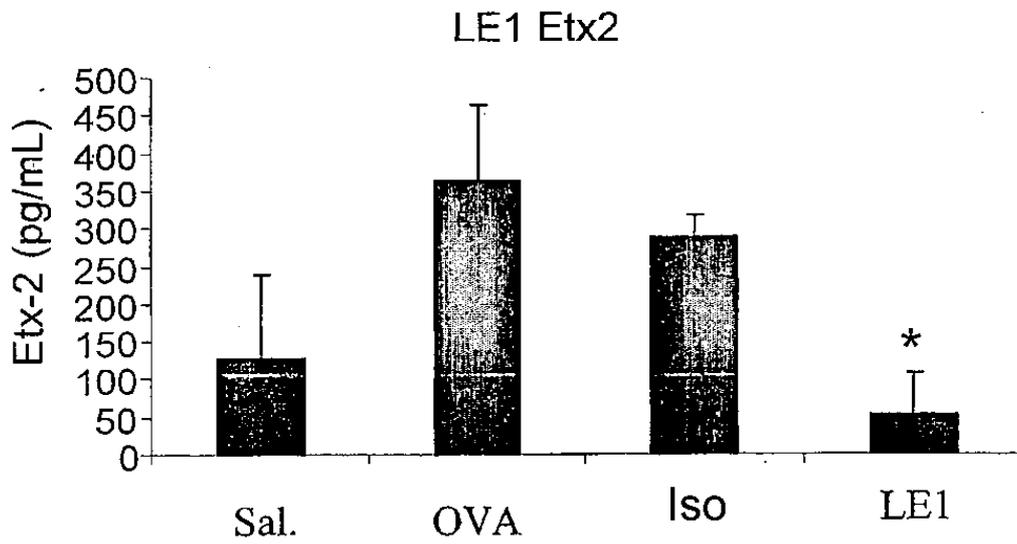


Fig. 15B

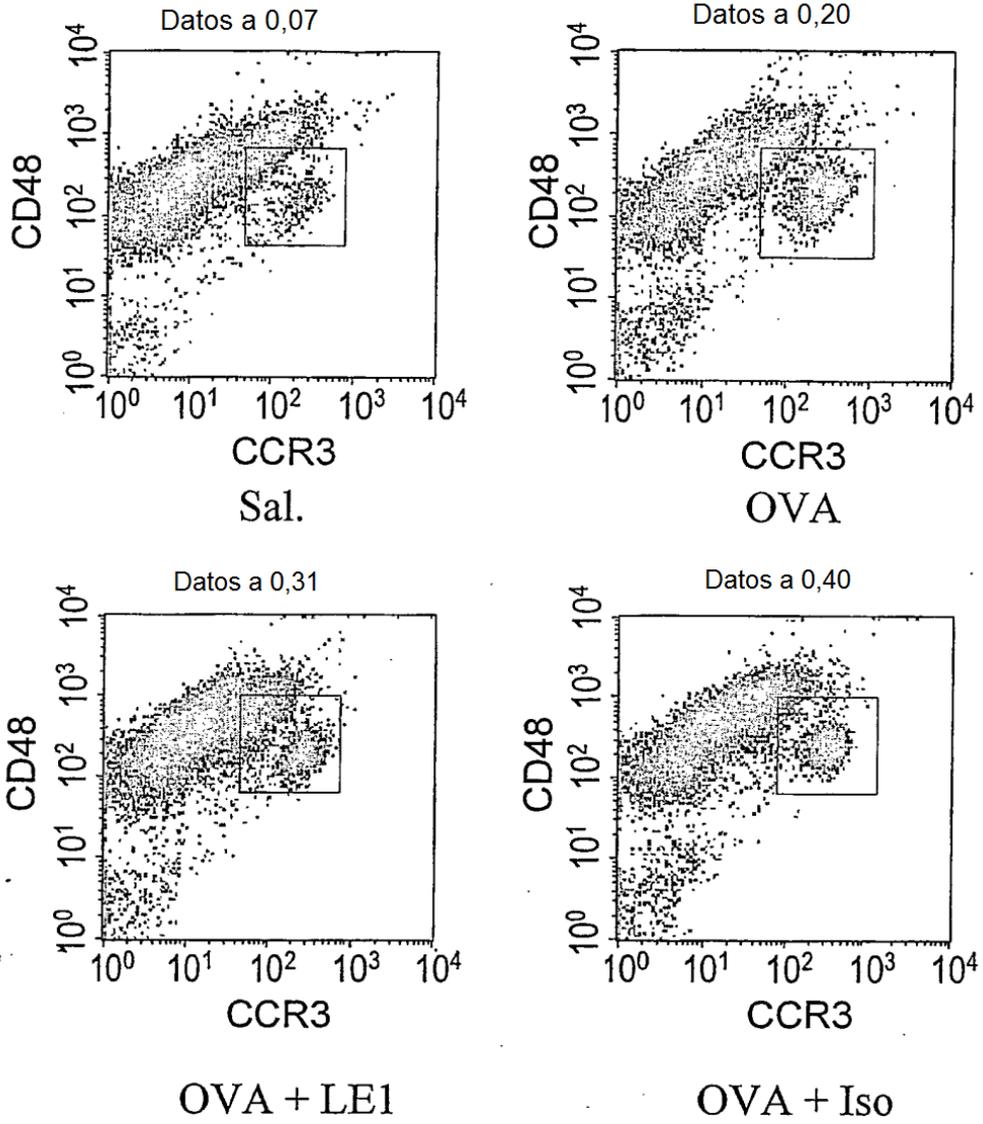


Fig. 16A

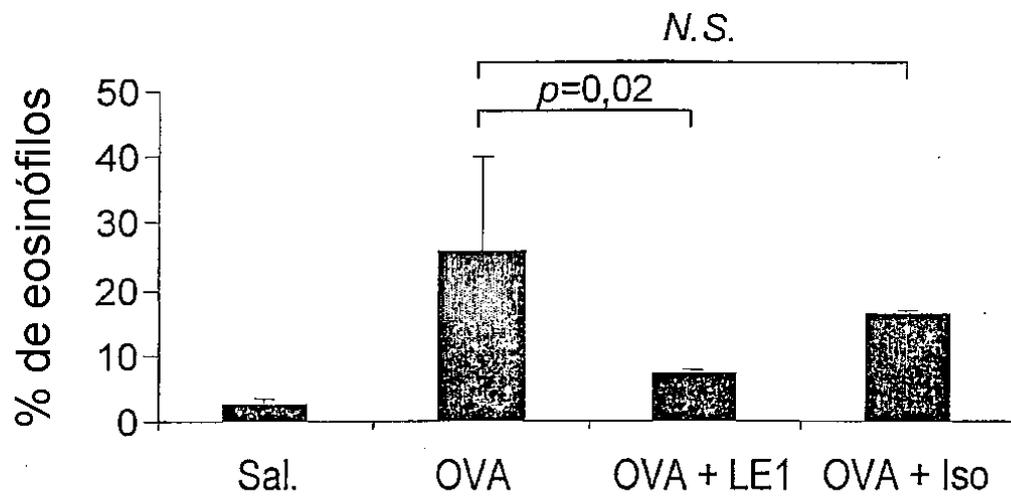


Fig. 16B

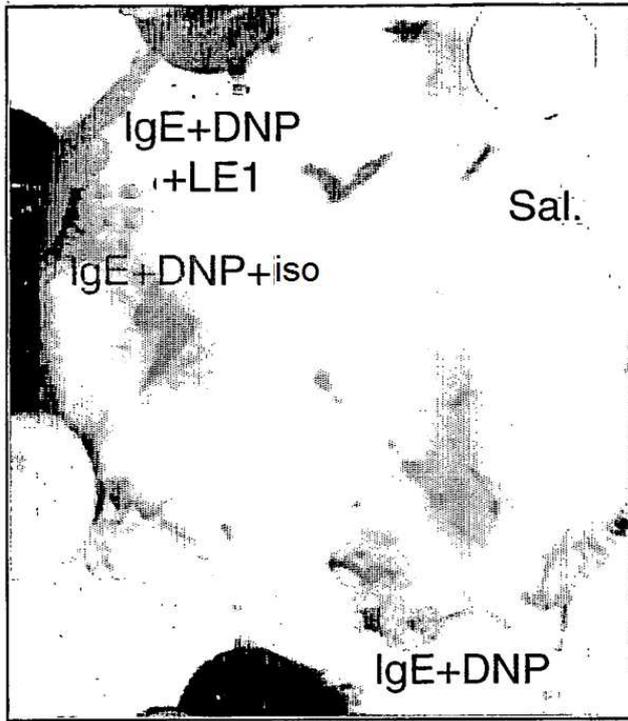


Fig. 17A

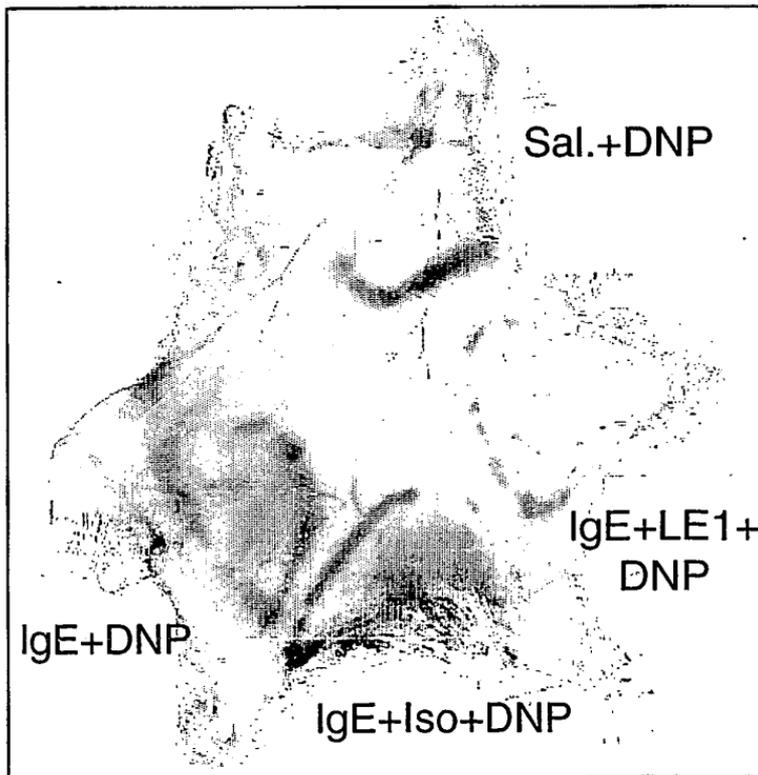


Fig. 17B