

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 278**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/42** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2009 E 09753934 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2282760**

54 Título: **Compuestos para uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedad inflamatoria del intestino**

30 Prioridad:

**28.05.2008 EP 08157033**

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

**28.01.2014**

73 Titular/es:

**DRUG DISCOVERY FACTORY B.V. (100.0%)**  
**Albrechtlaan 14a**  
**1404 AK Bussum, NL**

72 Inventor/es:

**VAN EGMOND, MARJOLEIN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 440 278 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**

Compuestos para uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedad inflamatoria del intestino

Campo de la invención

5 Se proporciona aquí un método para el tratamiento o profilaxis de enfermedades inflamatorias crónicas. Tales enfermedades se pueden tratar o prevenir administrando una cantidad eficaz de un compuesto que interfiere con la unión entre IgA y el receptor Fc para IgA (FcαR1 o CD89) a un paciente que necesita de tal tratamiento. En términos más mecánicos, se proporciona un método para disminuir la migración de células polimorfonucleares y/o la infiltración de células polimorfonucleares al bloquear la unión entre IgA y CD89. En otros términos, se proporciona aquí un método para prevenir la activación de células polimorfonucleares o células inmunitarias al bloquear la unión entre IgA y CD89, tal como bloqueando el sitio de unión a IgA en CD89, o bloqueando el sitio de unión a CD89 en IgA.

Antecedentes de la invención

15 Las enfermedades inflamatorias crónicas (CIDs) son una enorme carga en la sociedad. Desafortunadamente se carece de un tratamiento adecuado y específico, principalmente debido al hecho de que la causa de estas enfermedades todavía sigue siendo desconocida. Las CIDs (por ejemplo enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide (RA), asma, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme) también son un enorme esfuerzo en pacientes y sus familiares. La mayoría de estas enfermedades comienzan de forma temprana en la vida, y siguen siendo una carga para el resto de sus vidas. Las CIDs son a menudo debilitantes, con una recidiva frecuente, haciendo imposible trabajar durante períodos de tiempo prolongados. Además, los efectos psicológicos pueden ser devastadores.

25 Por lo tanto, estas enfermedades no sólo están asociadas con una morbilidad considerable sino también tienen un impacto importante sobre la vida social del paciente. Como resultado, estas afecciones también tienen consecuencias económicas significativas.

Los tratamientos disponibles para estas enfermedades tienden a ser puramente sintomáticos. Son enormemente ineficaces y de naturaleza no específica, puesto que la causa sigue siendo desconocida, a pesar del enorme esfuerzo por la sociedad médica de estudiar estas enfermedades. Los fármacos inmunosupresores pueden ofrecer alivio temporal, pero los síntomas casi siempre reaparecerán.

30 La dermatitis herpetiforme es un trastorno inflamatorio crónico raro de la piel. Esta enfermedad se caracteriza por lesiones abrasadoras que son muy irritantes y tienden a concentrarse en regiones particulares del cuerpo. La dermatitis herpetiforme afecta a aproximadamente 200.000 personas en los países industrializados, y puede conducir a problemas psicosociales y a una autoimagen negativa.

35 Después de que se ha establecido el diagnóstico de dermatitis herpetiforme, se pueden considerar unas pocas estrategias terapéuticas. El tratamiento actual de la enfermedad es puramente sintomático, puesto que la causa de la dermatitis herpetiforme sigue siendo enormemente desconocida a pesar de los enormes esfuerzos realizados por la sociedad médica. Los fármacos disponibles pueden ofrecer alivio temporal, pero siempre reaparecerán las manifestaciones de la enfermedad. Por tanto, existe una gran necesidad de desarrollar un nuevo tratamiento para la dermatitis herpetiforme. Los enfoques terapéuticos para la dermatitis herpetiforme incluyen, por ejemplo, una dieta libre de gluten y tratamiento con dapsona, colchicina, corticosteroides, sulfapiridina y/o ciclosporina. Más abajo se detallan estos tratamientos de la técnica anterior.

45 Aproximadamente el 75% de los pacientes con dermatitis herpetiforme tienen síntomas que se asemejan a la celiaquía. Además de las lesiones de la piel, estos pacientes tienen problemas gastrointestinales. Por lo tanto, se sugiere seguir una dieta libre de gluten una vez que se ha establecido la intolerancia al gluten. La respuesta exacta a esta terapia es desconocida, pero hasta el 50% de los pacientes intolerantes al gluten que tienen dermatitis herpetiforme se pueden beneficiar de una dieta libre de gluten. Sin embargo, puede tardar más de una década antes de que se observe un efecto. En general, una dieta libre de gluten necesita una gran disciplina. Cuando el efecto tarda años en ser exitoso, el cumplimiento con tal enfoque es generalmente bajo. Aunque algunos pacientes pueden estar libres de medicación usando este tratamiento, generalmente no es muy práctico.

50 La dermatitis herpetiforme se trata a menudo con dapsona. Sin embargo, este fármaco puede tener efectos secundarios indeseados. Todos los pacientes tratados con dapsona disminuyen sus niveles de hemoglobina. Esto está habitualmente relacionado con la dosis, y se monitoriza con ensayos de sangre. Sin embargo, algunos pacientes tienen una rápida caída en sus recuentos sanguíneos. Por esta razón, los ensayos de sangre se realizan semanalmente al comienzo, y después mensualmente. Además, la dapsona puede provocar cefaleas, náusea, erupción, insomnio, psicosis, neuropatía periférica, vómitos, dolor de garganta, fiebre, amarillamiento de la piel o de los ojos. Por lo tanto, muchos pacientes son reacios a cumplir con este tratamiento.

La colchicina también se usa en dermatitis herpetiforme. Sin embargo, la colchicina no es muy eficaz, y está asociada con efectos secundarios. Los efectos secundarios más habituales implican el estómago y el intestino, y están relacionados con la dosis. Los síntomas incluyen náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, pérdida de cabello, debilidad e irritación nerviosa. Además, puede provocar anemia grave y recuentos bajos de glóbulos blancos, lo que incrementa el riesgo de infecciones. La colchicina puede detener la división celular, y se evita en el embarazo, debido a los posibles efectos adversos sobre el crecimiento fetal.

Los corticosteroides (tales como prednisona) suprimen el sistema inmunitario y se usan para tratar dermatitis herpetiforme de moderada a gravemente activa. Aunque el tratamiento con corticosteroides sistémicos puede controlar los síntomas, las manifestaciones cutáneas reaparecen cuando se discontinúa. Los efectos secundarios a largo plazo de dosis elevadas de corticosteroides hacen a esta terapia menos adecuada para una medicación de mantenimiento.

La sulfapiridina se usa como tratamiento alternativo si no se puede usar la dapsona. Sin embargo, no es muy eficaz, y tiene varios efectos secundarios.

Algunas terapias de investigación experimentan con el uso de una dieta elemental y ciclosporina sistémica. La ciclosporina es un fármaco que suprime el sistema inmunitario, y esto puede ser un tratamiento prometedor para personas que no responden a otras terapias estándar. Pero este tratamiento puede estar asociado con un número de efectos secundarios, puesto que se suprimen tanto respuestas inmunitarias indeseadas (autoinmunidad) así como deseadas (contra patógenos). Esto último también es cierto para el tratamiento con corticosteroides.

Debido al número limitado de pacientes con dermatitis herpetiforme, la investigación y el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos en este campo están restringidos. Esta es una de las razones principales por las que se carece esencialmente de nuevos desarrollos en el tratamiento, y se desean enormemente en el campo tratamientos alternativos.

El tratamiento de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa, fue revisado ampliamente por Lichtenstein et al, *Gastroenterology* 130 (2006), p. 935-939. Los medicamentos revisados incluyen corticosteroides, azatioprina (AZA), 6-mercaptopurina (6-MP), metotrexato, micofenolato mofetil, ciclosporina, e infliximab.

Según la Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2007, los tratamientos habitualmente usados en COPD comprenden el uso de agonistas  $\beta_2$ , anticolinérgicos, metilxantinas, glucocorticosteroides, o sus combinaciones.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un fármaco altamente específico y eficaz para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por infiltración de células polimorfonucleares, tales como enfermedades inflamatorias crónicas (CIDs). Estas enfermedades incluyen enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide (RA), asma, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme.

#### Sumario de la invención

Parece que las CIDs, y en particular la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide (RA), asma, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme comparten un mecanismo común que es responsable de la destrucción tisular observada en estas enfermedades. Parecen caracterizadas por acumulación local de células polimorfonucleares, que son células del sistema inmunitario, más en particular por una acumulación local de neutrófilos y/o eosinófilos.

Hasta ahora se desconocía por qué se producía tal acumulación de células polimorfonucleares. Ahora se ha descubierto por el presente inventor que la unión de IgA a su receptor CD89 dispara una cascada de sucesos que incluyen la activación de células inmunitarias que conduce eventualmente a la migración, acumulación e infiltración de células polimorfonucleares.

Se muestra aquí que IgA tiene un papel previamente no reconocido a la hora de mediar la migración de células polimorfonucleares en ausencia del complemento, puesto que la selección como dianas de las células polimorfonucleares CD89 conduce a la liberación de leucotrieno B4 (LTB4), que es uno de los quimioatrayentes más potentes para las células polimorfonucleares, en particular neutrófilos (Parent CA. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16 (1): 4-13). Además, como se demuestra aquí que IgA dimérico (dIgA), que es producida normalmente en las superficies mucosales, es capaz igualmente de mediar la migración de células polimorfonucleares, se concluye que dIgA juega un papel activo a la hora de mantener la homeostasis mucosal. Mientras que IgA secretora (SIgA) sirve como un anticuerpo no inflamatorio en la superficie luminal de células epiteliales y constituye la primera línea de defensa, dIgA funciona como un anticuerpo inflamatorio en la membrana baso-lateral a través de interacciones con célula polimorfonuclear CD89, que representa una segunda línea de defensa.

Estos descubrimientos condujeron a la percepción de que al menos ciertas CIDs se pueden tratar eficazmente interfiriendo con la unión entre IgA y su receptor CD89.

Por lo tanto, la invención se refiere a un compuesto para uso según las reivindicaciones 1-6.

Descripción detallada de la invención

5 Las células polimorfonucleares o granulocitos son una categoría de glóbulos blancos caracterizada por la presencia de gránulos en su citoplasma. También se denominan leucocitos polimorfonucleares. Muestran una forma variable del núcleo, que habitualmente está lobulado en tres segmentos en el caso de neutrófilos, y bilobulado en el caso de eosinófilos. En el habla normal, la expresión células polimorfonucleares se refiere a menudo específicamente a granulocitos neutrófilos, los más abundantes de los granulocitos. Las células polimorfonucleares se liberan de la médula ósea por el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

Las células polimorfonucleares son la primera línea de defensa contra patógenos en el organismo. En particular, se encuentra que los neutrófilos y/o eosinófilos son los responsables del daño tisular amplio típico asociado con enfermedades inflamatorias crónicas; por lo tanto, estas enfermedades también se indican aquí mediante la frase "enfermedades caracterizadas por migración y/o infiltración de células polimorfonucleares".

15 Los granulocitos neutrófilos, generalmente denominados neutrófilos, son el tipo más abundante de células blancas en seres humanos, y forman una parte integral del sistema humanitario. Su nombre proviene de las características de tinción en preparaciones histológicas o citológicas con hematoxilina y eosina (H&E). Mientras que los componentes celulares basofílicos se tiñen de azul oscuro y los componentes eosinofílicos se tiñen de rojo brillante, los componentes neutrofilicos se tiñen de un rosa neutro. Estos fagocitos se encuentran normalmente en el torrente sanguíneo. Sin embargo, durante la fase aguda de inflamación, particularmente como resultado de la infección bacteriana, los neutrófilos abandonan la vasculatura y migran hacia el sitio de inflamación en un proceso denominado quimiotaxia. Son las células predominantes en el pus, dando cuenta de su aspecto blanquecino/amarillento. Los neutrófilos reaccionan en una hora de lesión tisular, y son la marca distintiva de la inflamación aguda. Los eosinófilos se caracterizan por tinción eosinofílica de sus gránulos, y están implicados predominantemente en infecciones parasitarias (por ejemplo gusanos).

Las CIDs comprenden una familia de enfermedades caracterizadas por infiltración de células polimorfonucleares. Estas enfermedades incluyen enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide (RA), asma, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme.

El que una enfermedad pertenezca o no al grupo de enfermedades caracterizadas por infiltración de células polimorfonucleares se puede determinar cuantificando el flujo de granulocitos en el tejido afectado de pacientes mediante técnicas estándar. En el Ejemplo 9 se ejemplifica un método particular útil.

35 CD89 es un receptor para la región Fc de IgA, y también se conoce como FCAR o Fc alfa RI. CD89 es codificado por un gen que es un miembro de la superfamilia génica de inmunoglobulinas. El receptor es una glucoproteína transmembránica presente en la superficie de células de estirpe mieloide tales como neutrófilos, monocitos, macrófagos, y eosinófilos, en la que media respuestas inmunológicas frente a patógenos. Se une a ambos isotipos de IgA con afinidad similar, e interactúa como dianas opsonizadas por IgA y dispara varios procesos de defensa inmunológica, incluyendo fagocitosis, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, y estimulación de la liberación de mediadores inflamatorios. Se han descrito para este gen diez variantes de transcrito que codifican diferentes isoformas.

45 Se encontró que CD89 se asocia con la molécula de señalización de la cadena gamma de FcR a través de un mecanismo basado en la carga único. De este modo, CD89 está conectado con la maquinaria intracelular vía los motivos de señalización ITAM localizados en la cola citoplásmica de la cadena gamma de FcR. Existen pruebas que apoyan receptores para IgA (distintos de CD89) en células T y B humanas. Por lo tanto, los receptores Fc de IgA pueden desempeñar un papel tanto en la inducción como en el control de una respuesta inmunitaria (mucosal) eficiente.

50 IgA es la principal clase de anticuerpo en áreas mucosales (aparatos gastrointestinal, respiratorio y genito-urinario), así como en secreciones externas, y juega un papel clave en la defensa mucosal (Woof et al., *Immunoglobulins*. *Immunol Rev.* 206: 64-82). Las superficies mucosales representan una vasta interfaz que protege el interior del cuerpo de las influencias externas. Mientras que los tejidos internos necesitan permanecer estériles a fin de proteger el organismo de una enfermedad potencialmente mortal, las superficies mucosales están colonizadas por microbios comensales, y están expuestas continuamente a antígenos y patógenos inhalados o ingeridos. Como tales, la homeostasis mucosal necesita un delicado equilibrio entre montar respuestas inmunológicas eficaces contra microorganismos patógenos, a la vez que se deben evitar respuestas excesivas contra microflora propia y antígenos dietéticos/inhalados (Pamer EG., *Nat Immunol.* 2007; 8 (11): 1173-8). De forma interesante, IgA está implicada tanto en respuestas anti- como proinflamatorias (Woof JM, et al., *J Pathol.* 2006; 208 (2): 270-82., Kerr MA., *Biochem J.* 1990; 271 (2): 285-96).

En los lados mucosales, IgA es producida por la lamina propia por células plasmáticas locales como molécula dímera con una cadena J de unión, y se denomina IgA dímera (dIgA) (van Egmond et al. Trends Immunol. 2001 (4): 205-11). dIgA se considera como una molécula intermedia, ya que - tras la unión a receptores de de Ig poliméricos (pIgR) - dIgA es transportada a través de células epiteliales y es segregada en la luz como IgA secretora (SIgA) (Brandtzaeg P. Int J Med Microbiol. 2003 293 (1): 3-15). Aunque se ha demostrado que dIgA tiene la capacidad para interceptar virus mientras están en tránsito a través de células epiteliales infectadas, y de este modo puede interferir de forma pasiva con la replicación vírica, todavía no se ha descrito un papel de activación para dIgA (Bums JW, et al., Science. 1996 272 (5258): 104-7). SIgA se considera un protector mucosal no inflamatorio. Forma un revestimiento "antiséptico" de la pared mucosal, que evita la adhesión de microorganismos y neutraliza productos bacterianos y virus, y como tal sirve como primera línea de defensa contra patógenos invasores (Brandtzaeg P. Int J Med Microbiol. 2003 293 (1): 3-15). Sin embargo, SIgA es una mala opsonina, y es incapaz de disparar la fagocitosis de bacterias *E. coli* por granulocitos neutrofílicos (neutrófilos) (van Egmond M et al. Nat Med. 2000 (6): 680-5).

Aproximadamente 1-3 mg/ml de IgA está presente además como forma monómera en la sangre (IgA sérica), donde representa la segunda clase de Ab prevalente tras IgG. La función de IgA sérica es compleja y no está completamente entendida (Woof JM, et al., J Pathol. 2006; 208 (2): 270-82). Por otro lado, se demostró que IgA sérica monomérica desempeña actividad antiinflamatoria, y es capaz de inhibir funciones inflamatorias inducidas por IgG (Nikolova EB et al., Leukoc Biol. 1995 57 (6): 875-82).

Adicionalmente, la selección como diana de CD89 con IgA sérica monomérica da como resultado señales inhibitoras o apoptosis en monocitos (Pasquier B et al., Immunity. 2005 (1): 31-42, Kanamaru et al., Blood. 2007; 109 (1): 203-11). Por otro lado, la reticulación de CD89 induce varias funciones inflamatorias tales como fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, presentación de antígenos y liberación de citocinas y mediadores inflamatorios (van Egmond et al. Trends Immunol. 2001 (4): 205-11., van Egmond M et al. Nat Med. 2000 (6): 680-5. Monteiro RC et al., Annu Rev Immunol. 2003; 21: 177-204). La función in vivo para células polimorfonucleares CD89 no se ha elucidado. Sin embargo, las bacterias de *E. coli* que son opsonizadas con IgA sérica humana son fagocitadas vigorosamente por células de Kupffer de ratones transgénicos para CD89. Como tal, las interacciones CD89-IgA sérica en células de Kupffer pueden actuar como línea adicional de defensa para eliminar bacterias que han invadido la circulación portal (van Egmond M et al. Nat Med. 2000 (6): 680-5). De este modo, CD89 puede actuar como un receptor bifuncional que induce funciones anti- o pro-inflamatorias de IgA, dependiendo de las circunstancias (van Egmond M. Blood. 2007; 109: 1-2).

Los factores del complemento pueden funcionar como quimioatrayentes para células polimorfonucleares. En contraste con IgM e IgG, IgA no se puede unir a C1q, que activa la cascada clásica del complemento. Por lo tanto, IgA es un mal activador del complemento. Se mostró que IgA activa las rutas alternativas o de lectina en condiciones in vitro específicas o en enfermedad (Janoff EN, et al., J Clin Invest. 1999 104 (8): 1139-47, Roos A, et al., J Immunol. 2001; 167 (5): 2861-8).

El término "IgA" se usa aquí para incluir todas las especies de inmunoglobulina A, incluyendo IgA dímera (dIgA), IgA monómera, IgA polímera e IgA secretora (SIgA).

Las propiedades y funciones biológicas de IgA y CD89 en la salud y en la enfermedad se han repasado por Otten y van Egmond en Immunol Lett 2004; 92: 23-31.

Se ha descubierto un mecanismo de enfermedad subyacente común responsable para el daño tisular en al menos ciertas CIDs. IgA está normalmente presente en el cuerpo humano en secreciones de mucosas, incluyendo lágrimas, saliva, calostro, jugo intestinal, fluido vaginal y secreciones de la próstata y epitelio respiratorio. También se encuentra en pequeñas cantidades en la sangre. Debido a que es resistente a la degradación por enzimas, SIgA puede sobrevivir en entornos rigurosos tales como los tubos digestivo y respiratorio, para proporcionar protección frente a microbios que se multiplican en secreciones corporales. Se descubrió que IgA interacciona con un receptor (CD89) en una célula específica del sistema inmunitario, las células polimorfonucleares, en particular con neutrófilos y/o eosinófilos. Esta interacción induce una cascada de sucesos que conducen a la migración e infiltración de otras células polimorfonucleares al sitio en el que está presente IgA, y consiguientemente a la inflamación y daño del tejido, provocando los síntomas de la CID.

Las CIDs en las que este mecanismo desempeña un papel particularmente importante incluyen enfermedades tales como enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide (RA), asma, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiacía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme.

Existen depósitos de IgA en la piel de pacientes con dermatitis herpetiforme, haciendo esta enfermedad un sistema modelo particularmente adecuado para investigar el mecanismo detrás de la migración e infiltración de células polimorfonucleares inducida por IgA. Por lo tanto, se estudió el papel de IgA en la patogénesis de la dermatitis herpetiforme como un sistema modelo para CIDs en las que está implicada IgA.

En dermatitis herpetiforme, IgA se deposita justo debajo de la superficie de la piel (papilas dérmicas); esto no ocurre normalmente en individuos sanos. La razón para estos depósitos de IgA es desconocida; se muestra aquí que los agregados de IgA disparan directamente la migración de células polimorfonucleares a través de la interacción con un receptor (CD89) en la superficie celular de las células polimorfonucleares. Esto da como resultado grandes acumulaciones de células polimorfonucleares en el sitio de las deposiciones de IgA. Además, los depósitos de IgA activan las células polimorfonucleares locales, y provoca desgranulación y liberación de moléculas inflamatorias. La acumulación, activación y desgranulación subsiguiente de células polimorfonucleares son responsables del daño a la piel y la formación de ampollas. Puesto que la deposición de IgA es continua, las células polimorfonucleares reclutadas encontrarán más agregados de IgA. En consecuencia, estas células polimorfonucleares se activan igualmente, sosteniendo por la presente un bucle inflamatorio perpetuo que provoca la destrucción tisular.

Este hallazgo no sólo arroja nueva luz en nuestra comprensión de las CIDs, sino también puede contribuir directamente al desarrollo de un nuevo fármaco para tratar ciertas CIDs, tales como enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide (RA), asma, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme. Si la interacción entre IgA y el receptor (CD89) en las células polimorfonucleares tales como neutrófilos se bloquea, entonces la reacción inflamatoria se detiene y el paciente se cura.

Se proporciona aquí un método para disminuir la migración de células polimorfonucleares y/o la infiltración de células polimorfonucleares al bloquear la unión entre IgA y CD89.

También se describe un método para disminuir la excreción de LTB<sub>4</sub> a partir de células polimorfonucleares bloqueando la unión entre IgA y CD89.

También se describe un método para prevenir la activación de células inmunitarias bloqueando la unión entre IgA y CD89.

También se describe un compuesto que bloquea la unión entre IgA y CD89 para el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide (RA), asma, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme.

También se describe un compuesto que bloquea la unión entre IgA y CD89 para disminuir la migración de células polimorfonucleares y/o la infiltración de células polimorfonucleares.

También se describe un método para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad caracterizada por infiltración de células polimorfonucleares, en el que se bloquea la unión entre IgA y CD89.

También se describe un método para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad infecciosa crónica seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide (RA), asma, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme, en el que se bloquea la interacción entre IgA y CD89.

Bloquear la interacción entre IgA y CD89, o "interferir con" la unión de IgA al sitio de unión a IgA en CD89, o el sitio de unión a CD89 en IgA, significa, a este respecto, que en efecto se disminuye la unión de IgA a CD89. En términos moleculares, esto puede significar que menos moléculas de IgA se unen al sitio de unión a IgA del receptor CD89, y/o que IgA se une con menos afinidad. La menor unión de IgA al receptor CD89 se puede medir mediante ensayos directos como se conoce en la técnica o como se ejemplifica aquí, o mediante ensayos funcionales midiendo la migración de células polimorfonucleares hacia perlas revestidas con IgA. (Morton et al., J. Exp. Med. 1999; 189 (11): 1715-22).

En base a estos hallazgos y ayudados por el hecho de que la estructura de las dos moléculas implicadas (IgA y CD89) es conocida en la técnica (Herr AB et al. Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human FcαRI and its complex with IgA1-Fc. Nature. 2003; 423 (6940): 614- 20), ahora se pueden diseñar fácilmente compuestos bloqueantes muy específicos y eficaces, tales como péptidos y anticuerpos, usando técnicas de síntesis peptídica conocidas en la técnica. Ahora está dentro de las pericias normales de una persona experta en la técnica seleccionar los candidatos líderes más prometedores usando ensayos de laboratorio habituales.

Las moléculas adecuadas que pueden interaccionar con la unión entre IgA y su receptor CD89 son, por ejemplo, anticuerpos, una variante soluble de CD89, o péptidos tales como péptidos sintéticos. Existen comercialmente anticuerpos con la especificidad deseada (tales como, por ejemplo, MCA 1824XZ, disponible de AbD Serotec), y también se han descrito en Zhang et al., Clin. Exp. Immunol 121: 106-11.

Tales anticuerpos son preferiblemente anticuerpos incapaces de la activación del complemento, como se describe en el documento WO 02/064634. Aquí, se distinguen dos clases de anticuerpos anti-CD89. La primera clase consiste en anticuerpos no inhibidos por IgA, es decir, se unen a CD89 en un sitio diferente del sitio de unión a IgA. También se describen allí anticuerpos que inhiben la unión de IgA a CD89, es decir, se unen a CD89 en un sitio que está en o estructuralmente cerca del sitio de unión a IgA. Esos últimos anticuerpos pueden ser particularmente útiles en la presente invención.

Además, en el documento WO 02/064634 se sugiere que tales anticuerpos se pueden usar para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por IgA endógena anormal. Se afirma que los ejemplos de tales enfermedades son hepatitis crónica, nefropatía por IgA o glomerulonefritis por IgA. Está claro que tales enfermedades se caracterizan por complejos circulantes de IgA anormal, y/o precipitación de IgA en complejos inmunitarios de IgA anormal. El término anormal en este contexto se ha de interpretar que significa IgA con una especificidad que no aparece normalmente en el cuerpo humano sano, y/o complejos de IgA que no aparecen normalmente en una cierta localización en el cuerpo humano, es decir, en una localización anormal. En hepatitis crónica, el anticuerpo IgA anormal se dirige contra una infección vírica, mientras que en nefropatía por IgA o glomerulonefritis por IgA los complejos de IgA se encuentran en localizaciones anormales, es decir, los riñones.

Además, el documento WO 02/064634 describe el tratamiento de cáncer o trastornos autoinmunitarios usando anticuerpos biespecíficos capaces de seleccionar como dianas tanto a las células inmunitarias que poseen CD89 como a células diana específicas. El documento WO 02/064634 describe allí la activación de células efectoras que expresan CD89, al puentear las células efectoras y las células diana, induciendo de ese modo una función de células efectoras que da como resultado la lisis de la célula diana, a fin de eliminar linfocitos productores de autoanticuerpos. La desventaja de esta técnica, sin embargo, es que también se pueden eliminar otros linfocitos, reduciendo de ese modo la inmunidad contra todo tipo de infecciones.

También se describe aquí un método para disminuir la migración de células polimorfonucleares y/o la infiltración de células polimorfonucleares bloqueando la unión entre IgA y CD89. Los anticuerpos biespecíficos descritos en el documento WO 02/064634 no son por lo tanto útiles en la presente invención, puesto que estas moléculas están diseñadas para activar células polimorfonucleares.

Por lo tanto, se describe un método para disminuir la migración de células polimorfonucleares y/o la infiltración de células polimorfonucleares bloqueando la unión entre IgA y CD89, en el que el agente usado para el bloqueo no es un anticuerpo biespecífico capaz de seleccionar como dianas tanto a células inmunitarias que poseen CD89 como a un linfocito productor de autoanticuerpos.

En otras palabras, se describe un método para disminuir la migración de células polimorfonucleares y/o la infiltración de células polimorfonucleares bloqueando la unión entre IgA y CD89, en el que el agente usado para el bloqueo no es capaz de activar células polimorfonucleares.

Se describe aquí el uso de anticuerpos o péptidos para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la migración y/o infiltración de células polimorfonucleares, por ejemplo debido a la presencia de complejos inmunitarios de IgA normal en localizaciones en las que tal IgA aparece normalmente en el cuerpo humano sano. El término normal en este contexto se ha de interpretar como IgA con una especificidad que normalmente se produce en el cuerpo humano sano, y/o complejos de IgA que normalmente se producen en una cierta localización en el cuerpo humano, es decir, en una localización normal.

El documento WO 02/064634 no dice nada sobre cómo disminuir la migración y/o infiltración de células polimorfonucleares en tales enfermedades. Los ejemplos de enfermedades para las cuales la presente invención proporciona una terapia eficaz son, por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide (RA), asma, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme.

El documento WO 01/723330 describe métodos y composiciones para eliminar patógenos del sistema circulatorio de un sujeto. Estos métodos se basan en la interacción entre IgA monómera (sérica) y CD89 expresado en células de Kupffer hepáticas. Los métodos emplean complejos terapéuticos que están formados por una primera porción que se une específicamente a Fc alfa RI expresado en células de Kupffer hepáticas, o que se une específicamente a IgA monómera o a su región Fc, enlazada a una segunda porción que se une específicamente a la célula o antígeno diana.

Monteiro et al. describe la generación y aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos contra CD89. Se encontró que estos anticuerpos no bloquean la unión a IgA (Monteiro et al., J. Immunol. 148, 1764-1770). Se describe que tales anticuerpos no bloqueantes son útiles para lograr la inhibición de la transducción de señales o la apoptosis (Kanamura et al., J. Immunol 2008, 180; 2669-2678).

El documento WO 2005089798 describe el uso de un fragmento de anticuerpo monovalente dirigido contra el dominio EC2 de CD89 para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. El dominio EC2 es distinto del dominio de unión a IgA en CD89.

En contraste con el presente hallazgo, Sibille et al. describen que la quimiotaxia de neutrófilos humanos hacia quimioatrayentes se puede inhibir mediante la adición de IgA (Mol. Immunol. (1987) 24; 551-559). En ese momento, el receptor para IgA todavía era desconocido, y no está claro si midieron o no una interacción entre IgA y CD89. Sin embargo, esto es improbable, puesto que no hubo diferencia observada en el efecto de IgA sérica e IgA secretora que se podría esperar en el caso de CD89.

Para investigar si la interferencia con la interacción entre CD89 e IgA reduce la migración de células polimorfonucleares, se realizaron experimentos de migración en presencia de anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-CD89 o de péptidos que imitan el sitio de unión a IgA en CD89 o el sitio de unión a CD89 en IgA. Cuando se preincubaron células polimorfonucleares con anticuerpos monoclonales anti-CD89 que interfieren específicamente con el sitio de unión a IgA en CD89, se redujo la migración hacia perlas de IgA.

Los anticuerpos que interfieren específicamente con el sitio de unión a IgA en CD89 son conocidos en la técnica. Se ejemplifican aquí anticuerpos MIP8a, 2D11 o MY43 como se describe en Morton et al., J. Exp. Med. 7 de junio de 1999; 189 (11): 1715-22 y Shen L.A., J Leukoc Biol., abril de 1992; 51 (4): 373-8.

Se muestra aquí que estos anticuerpos son capaces de disminuir la migración de células polimorfonucleares y/o la infiltración de células polimorfonucleares bloqueando la unión entre IgA y CD89, por cuanto bloquean el sitio de unión a IgA en CD89.

En un marco experimental como se describe en el Ejemplo 4, se determinó que estos anticuerpos fueron capaces de bloquear eficazmente la interacción entre IgA y CD89, aunque a diferentes niveles. MY43 fue capaz de bloquear la interacción alrededor de 30%, 2D11 mostró un bloqueo de alrededor de 25%, mientras que Mip8a mostró un bloqueo de entre 75% y 90%. También pareció que FcalfaR1 (sFcalfaR1) soluble bloquea eficientemente la interacción (figura 6).

También se describe aquí un compuesto que bloquea la unión entre IgA y CD89 para el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, COPD, asma, artritis reumatoide, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme.

También se describe un compuesto que bloquea la unión entre IgA y CD89 para disminuir la migración de células polimorfonucleares y/o la infiltración de células polimorfonucleares.

Además, también se redujo la migración de células polimorfonucleares cuando se impidió la interacción entre IgA y CD89s mediante adición de péptidos que imitan el sitio de unión a IgA en CD89 o el sitio de unión a CD89 en IgA. De este modo, IgA induce migración de células polimorfonucleares, que se puede reducir interfiriendo con las interacciones IgA-CD89.

También se describe aquí un péptido que bloquea la unión entre IgA y CD89 para el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, COPD, asma, artritis reumatoide, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme.

En otras palabras, se proporciona aquí un péptido que bloquea la unión entre IgA y CD89 para disminuir la migración de células polimorfonucleares y/o la infiltración de células polimorfonucleares.

De este modo, péptidos terapéuticos específicamente diseñados pueden servir al objeto de bloquear la interacción específica entre IgA y CD89. Los péptidos tienen varias características que los hacen muy atractivos como agentes terapéuticos. Los péptidos tienen propiedades de unión muy específicas hacia la diana de interés y tienen menos acumulación en el tejido, reduciendo el riesgo de efectos secundarios como resultado de la producción de metabolitos intermedios. Muestran una elevada especificidad, asegurando una excelente actividad biológica y una baja toxicidad. Esto es especialmente cierto para fármacos con un efecto inmunomodulador.

Ahora se pueden diseñar péptidos que interfieren con la unión entre IgA y el sitio de unión a IgA en CD89 usando la estructura primaria conocida de IgA o CD89. Los detalles de la estructura cristalina del complejo entre CD89 e IgA son conocidos, y ese conocimiento facilita enormemente el diseño de péptidos eficaces. Para el diseño de un péptido sintético que imita la superficie de un sitio de interacción proteica, se puede seleccionar una región en IgA o en CD89 que muestra la cantidad más elevada de contactos de unión en un tramo secuencial de restos, por ejemplo un tramo con una longitud de 15 a 25 aminoácidos. También, se pueden realizar algunas variaciones para estabilizar los péptidos, de tal manera que estén fijados en una estructura activa biológica.

Como se muestra en la sección de ejemplos, se seleccionó un tramo de 17 meros (aminoácidos 431-447: SSMVGHEAL**PLAFT**QKT (SEC ID NO: 1) PEO-45#7,8 en la figura 6) a partir de la región Fc de IgA, y se usó con éxito para interferir con la unión de IgA con el sitio de unión a IgA en CD89. Se predijo que los restos en negrita y subrayados tienen el máximo contacto con el sitio de interacción. En varios experimentos diferentes, este péptido

mostró consistentemente su capacidad para bloquear la unión entre IgA y CD89 en una cantidad entre 50 y 70% cuando se mide en el ensayo detallado en el ejemplo 4. Se seleccionaron tres péptidos más a partir de la región Fc de IgG, y se usaron con éxito para interferir con la unión de IgA con el sitio de unión a IgA en CD89. Se encontró que los péptidos IgA CH2: EDLLLSEA (SEC ID NO: 4), péptido IgA CH3: HEALPLAFTQK (SEC ID NO: 5), y péptido PEO-47mP2#2,3; CSMVGHEALPLAFTQKC (SEC ID NO: 6) bloquean la unión entre IgA y CD89 hasta 23%, 18% y 20%, respectivamente. Esto se muestra gráficamente en la figura 6. También el péptido PEO-46#7,8 SCMVGHEALPLAFTQCT (SEC ID NO: 8) proporcionó buenos resultados.

También se muestra aquí que un péptido se puede diseñar con éxito usando como punto de partida la estructura primaria del receptor CD89. Se sabe que dos regiones principales de CD89 contactan con la interfaz de Ig de IgA<sub>FC</sub>; se denominan el bucle EF y el bucle CD, aminoácidos 75-92 y aminoácidos 49-59, respectivamente.

Se encontró que el péptido del bucle EF (CD89 75-92): GRYQAQYRIGHYFRYSD (SEC ID NO: 2), denominado PEO-50#8,9 en la figura 6, y el péptido del bucle CD (CD89 49-59): EIGRRLKFWNE (SEC ID NO: 3) bloquean la interacción entre IgA y CD89 en una cantidad entre 50 y 100%. El péptido Sym-060, con la secuencia GRYQCQYRIGHYFRYSD (SEC ID NO: 9), se comportó en cierto modo peor, pero todavía se encontró que era útil en la presente invención.

El péptido Fc alfa 113: REIGRRLKFWNETDP (SEC ID NO: 7) bloqueó la interacción entre IgA y CD89 en una cantidad de hasta 19% (figura 6). Los péptidos LKFWNETDP (SEC ID NO: 10), AQAIREAYL (SEC ID NO: 11) y YRIGHYRFR (SEC ID NO: 12) también se comportaron bien en un método según la invención.

Puesto que se conocen los detalles de la estructura cristalina del complejo CD89:IgA (Herr et al.), ahora está dentro de las pericias normales de una persona experta el seleccionar otros péptidos apropiados con las propiedades de unión requeridas.

En conclusión, se diseñaron varios péptidos que bloquearon eficazmente la interacción entre IgA y CD89, y por tanto son candidatos farmacéuticos útiles para prevenir la migración y/o infiltración de células polimorfonucleares en enfermedades tales como enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide (RA), asma, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme. Como consecuencia, estos péptidos se pueden usar eficazmente para tratar las enfermedades anteriores.

El fármaco candidato así identificado se puede mezclar con un vehículo farmacéutico adecuado y se puede ensayar en el sistema de modelo de ratón como se describe aquí, o directamente en pacientes, tales como pacientes con dermatitis herpetiforme. El fármaco se puede aplicar en ese caso localmente en un ungüento, limitado a unos pocos blíster, de manera que se pueden evitar efectos secundarios sistémicos. Además, la eficacia del fármaco se puede monitorizar directamente, y se pueden observar efectos secundarios locales (erupción, picazón, etc.). Esto tiene la ventaja adicional de que se pueden omitir ensayos clínicos de fase I en voluntarios sanos.

El fármaco potencial proporcionará un tratamiento para CIDs, tales como enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide (RA), asma, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme, pero también potencialmente para otras CIDs. La dermatitis herpetiforme es muy similar a la colitis ulcerosa, puesto que ambas enfermedades se caracterizan por la presencia de IgA normal así como grandes acumulaciones de células polimorfonucleares. La colitis ulcerosa es también una enfermedad inflamatoria crónica. Los pacientes con colitis ulcerosa sufren dolor abdominal, diarrea sanguinolenta, pérdida de peso y dolor articular. Estos síntomas pueden ser bastante graves, con recidivas frecuentes. Por lo tanto, este fármaco puede proporcionar una solución para cientos de miles de personas que sufren enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, u otras CIDs, como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis reumatoide (RA), asma, rinitis alérgica y no alérgica, alergias alimentarias tales como celiaquía, y enfermedades de la piel tales como enfermedad ampollosa por IgA lineal o dermatitis herpetiforme.

El fármaco se podría usar para seleccionar localmente como dianas a los sitios inflamatorios usando la tecnología de plataforma de Actogenix (Bélgica). En COPD, se podría usar terapia de inhalación, mientras que el tratamiento de enfermedades sistémicas requerirá la aplicación sistémica.

Leyendas a las figuras.

Figura 1. Mecanismo de bucle inflamatorio en colitis ulcerosa.

Papel de IgA y CD89 en inflamación del tubo digestivo. Cuando las bacterias entran en las capas superficiales del intestino (lamina propia), se opsonizan con IgA. Las células polimorfonucleares interaccionan con estas bacterias opsonizadas con IgA, y se activan y liberan moléculas que provocan la migración de células inmunitarias, incluyendo células polimorfonucleares adicionales. Las células

polimorfonucleares recientemente llegadas también se activan, lo que conduce a un bucle inflamatorio perpetuo, dando como resultado daño tisular grave.

Figura 2. IgA induce movimiento y desgranulación de células polimorfonucleares.

5 A) Se añadieron perlas revestidas con BSA, con IgG o con IgA a capas mononucleares de células polimorfonucleares PKH67 en reposo (PMNs) durante 20' a 37°C, después de lo cual las células se lisaron y se determinó la fluorescencia como medida del número de células que habían migrado a las perlas. B) Las perlas se revistieron con concentraciones crecientes de BSA, IgG o IgA, y se añadieron a monocapas de células polimorfonucleares PKH67 en reposo durante 20' a 37°C, después de lo cual se determinó la concentración de lactoferrina en el sobrenadante como medida para la activación/desgranulación. C) Para los ensayos de unión, se mezclaron perlas revestidas con IgG y con IgA con células polimorfonucleares PKH67 durante 20' a 4°C, después de lo cual las células se lisaron y se determinó la fluorescencia como medida del número de células que se habían adherido a las perlas. Se muestra un experimento representativo de seis.

Figura 3. Migración dirigida de células polimorfonucleares en respuesta a IgA.

15 Se determinaron (n = 30/situación) las rutas de las trayectorias y la dirección de células polimorfonucleares tras la adición de perlas revestidas con BSA, con IgG, o con IgA. Se muestra la velocidad media (A) y la distancia recorrida (B) de las células polimorfonucleares en respuesta a perlas revestidas. Se muestra un ejemplo representativo de cinco.

Figura 4. La reticulación de Fc $\alpha$ RI de células polimorfonucleares por IgA induce la liberación de LTB<sub>4</sub>.

20 Se recogieron sobrenadantes 20' tras la adición de perlas revestidas con IgA, con IgG o con BSA a una monocapa de células polimorfonucleares en reposo.

A) Números de células polimorfonucleares recientemente aisladas que han migrado a sobrenadantes en los compartimentos inferiores de cámaras de pocillo ciego.

25 B) Se recogió sobrenadante tras la adición de perlas revestidas con IgA, y se midió la migración de células polimorfonucleares recientemente aisladas a sobrenadante recogido en presencia de anti-BLTR1 (receptor LTB<sub>4</sub>), anti-IL-8 o un control de mAb isotipo. Adicionalmente, se añadió un antagonista del receptor LTB<sub>4</sub> (U75302 en etanol) o etanol solo. La migración a sobrenadante en ausencia de inhibidores se ajustó a 100%.

C) Se determinó la presencia de LTB<sub>4</sub> en sobrenadantes. Se muestra un ejemplo representativo de tres.

30 Figura 5. La fagocitosis de bacterias de E. coli revestidas con IgA conduce a la liberación de estímulos quimiotácticos.

Se recogieron sobrenadantes 30' tras la co-incubación de células polimorfonucleares con bacterias E. coli revestidas con BSA o con IgA. Se determinaron los números de células polimorfonucleares recientemente aisladas que han migrado a sobrenadantes en los compartimentos inferiores de cámaras Boyden.

35 Figura 6. La migración inducida por IgA se puede reducir interfiriendo con las interacciones IgA-CD89. Porcentaje de inhibición de migración de células polimorfonucleares en presencia de 3 mAb anti-Fc $\alpha$ RI diferentes (barras blancas), 6 péptidos que imitan el sitio de unión a IgA en CD89 o el sitio de unión a CD89 en IgA (barras negras), o una variante soluble de CD89 o Fc $\alpha$ RI (sFc $\alpha$ RI, barra gris).

40 Figura 7: Porcentaje de unión de células polimorfonucleares a IgA en ausencia o presencia de reactivo bloqueante. Porcentaje de unión de células polimorfonucleares a IgA en ausencia de reactivo bloqueante (valor de ajuste, barra punteada), o en presencia del mAb anti-Fc $\alpha$ RI MIP8a (barra blanca) o 3 péptidos que imitan el sitio de unión a IgA en CD89 o el sitio de unión a CD89 en IgA (barras negras).

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Aislamiento y marcaje de células polimorfonucleares

45 Se aislaron células polimorfonucleares de muestras de sangre periférica heparinizadas, que se obtuvieron de donantes sanos, mediante centrifugación mediante gradiente de densidad Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Noruega) estándar. Para lisar eritrocitos, el pelete se resuspendió en un tampón de cloruro de amonio (155 mM, 10', 4°C). Se resuspendieron células polimorfonucleares en RPMI 1640 (Gibco BRL, Paisley, UK) suplementado con 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor, glutamina y antibióticos (RPMI/10%). Los estudios fueron aprobados por el Comité Ético Médico de VU University Medical Center (Países Bajos), según la Declaración de Helsinki. Todos los donantes firmaron una autorización.

Las células polimorfonucleares se marcaron fluorescentemente con PKH67 (células polimorfonucleares marcadas con PKH67), según las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Para experimentos de quimiotaxia, las células polimorfonucleares se marcaron durante 30' a 37°C con 1  $\mu$ M de calceína-AM (Molecular Probes, Eugene, OR). La viabilidad se evaluó con exclusión del azul de tripano. Las células polimorfonucleares se dejaron sedimentar (2 h, 37°C) antes de todos los experimentos.

#### Ejemplo 2: Preparación de perlas revestidas con inmunoglobulina.

Todos los experimentos se llevaron a cabo con dos tipos de perlas revestidas con inmunoglobulina. Se obtuvieron perlas de nitrocelulosa como se describe previamente (Gulle et al., J. Immunol. Methods 214, 199 (1998)). De forma breve, se disolvió nitrocelulosa (Sigma) en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), y se hizo precipitar añadiendo agua milli Q. Las perlas de tamaño apropiado se seleccionaron usando tiempos de sedimentación en gravedad normal. Las perlas de nitrocelulosa previamente humedecidas se incubaron con diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), IgA monómera (denominada IgA; Cappel, Solon, OH y Sigma), SIgA (Cappel), IgG (Sigma y Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Países Bajos) durante 3 h a 4°C. IgA dímera (específica para PorA de meningococos del grupo B) se produjo como se describe previamente (Vidarsson G et al. J Immunol. 2001; 166:6250-6). Los análisis de separación en gel confirmaron que IgA sérica fue principalmente monómera, mientras que SIgA e IgA dímera consistieron en dímeros. Las perlas se centrifugaron (20", 14000 rpm), y los sitios de unión a proteína libres se bloquearon durante 30' a 37°C con PBS que contiene 5% de BSA (PBS/BSA). Tras el lavado, las perlas se suspendieron en RPMI/10%. Como alternativa, se acoplaron diferentes concentraciones de BSA o inmunoglobulinas a perlas de sefarosa activadas por CNBr según las instrucciones del fabricante (GE healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia).

#### Ejemplo 3: Ensayos tridimensionales de migración de células polimorfonucleares:

Se prepararon geles de colágeno como se describe (Otten et al., J. Immunol. 174: 5472-80 (2005)). Se añadieron perlas revestidas con inmunoglobulina (100  $\mu$ l/ml), y 1 ml/pocillo de esta mezcla se colocó en placas de 24 pocillos y se dejó coagular, tras lo cual se añadieron  $1 \times 10^6$  células polimorfonucleares. Después de 2 h o 4 h a 37°C, los geles de colágeno se fijaron y se embebieron en parafina como se describe previamente. Los portaobjetos se tñieron con hematoxilina de Mayers (Klinipath, Duiven, Países Bajos).

Se llevaron a cabo registros en vídeo en tiempo real de la migración de las células polimorfonucleares ( $1 \times 10^6$ /pocillo; placa de 24 pocillos, Greiner Bio One, Kremismuenster, Austria) con un microscopio de contraste de fases invertido (Nikon Eclipse TE300, Tokio, Japón) encerrado en una cámara de temperatura controlada (37°C) humidificada, gasificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Se registraron durante 20' min. campos seleccionados al azar. Se hicieron fotos cada 15" con una cámara Olympus ColorView II. Para hacer el seguimiento de los experimentos, se usó un intervalo de 7". Los registros se analizaron usando software CELL F trackIT (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Alemania).

#### Ejemplo 4: Ensayos bidimensionales de migración de células polimorfonucleares:

Se sembraron células polimorfonucleares marcadas con PKH67 ( $2,5 \times 10^5$  células/pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner), después de lo cual se añadieron perlas revestidas con inmunoglobulina (10  $\mu$ l/pocillo). Para los ensayos de unión, las células se mantuvieron a 4°C. Para los ensayos de migración, las células se incubaron durante 20' a 37°C, después de lo cual se recogieron las suspensiones celulares, y las perlas se lavaron 2 veces con PBS para eliminar las células polimorfonucleares marcadas con PKH67 no unidas. Las perlas se incubaron con un tampón que contiene 2,0 g/l de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 1,0 g/l de Tween 20, 2,0 g/l de BSA y 7,44 g/l de EDTA en PBS, para lisar las células polimorfonucleares marcadas con PKH67 unidas. La fluorescencia se midió usando filtros con 485 de excitación y 520 de emisión (Fluostar Galaxy, BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania).

Adicionalmente, se añadieron células polimorfonucleares marcadas con PKH67 ( $1 \times 10^6$ /pocillo) a placas de 24 pocillos de fondo plano que contienen un cubreobjetos de vidrio redondo revestido con Matrigel™ (diluidas 1:4 en PBS; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Se añadieron perlas revestidas con inmunoglobulina (40  $\mu$ l/pocillo), y después de un tiempo de incubación de 20' a 37°C, las placas se centrifugaron (5', 500 rpm). Las células se fijaron con formalina tamponada al 4% en PBS (20', RT). Los cubreobjetos se embebieron con Aquamount (Gurr BDH Chemicals Ltd, Poole, UK), y se analizaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM6000B (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) y un microscopio de barrido por láser confocal Leica TCS SP2 AOBS.

#### Ejemplo 5: Experimentos con animales.

La generación de ratones transgénicos (Tg) para Fc $\alpha$ RI se describió previamente (van Egmond et al., Blood 93: 4387-94 (1999)). Se criaron ratones y se mantuvieron en la Central Animal Facility del VU University Medical Center, Ámsterdam, Países Bajos, en condiciones estándar. Se inyectaron intradérmicamente (30  $\mu$ l) perlas revestidas con BSA o con IgA en PBS/tinta india 1:100 para visualizar los sitios de inyección. Los animales se sacrificaron después de 72 h, y se tomaron biopsias de la piel. La presencia de células polimorfonucleares se visualizó tñiendo portaobjetos con mAb anti-GR-1 de ratón de rata (BD Biosciences), y anticuerpos anti-rata de cabra marcados con

peroxidasa de rábano picante (HRP). Como sustrato, se usó 3-amino-9-etilcarbazol (BD Biosciences). Todos los experimentos se realizaron según directrices institucionales y nacionales.

#### Ejemplo 6: Ensayo de quimiotaxia

5 Los ensayos de quimiotaxia se llevaron a cabo esencialmente como se describió (Frevert et al., J. Immunol. Methods 213, 41 (1998)), modificados para uso en una cámara de quimiotaxia de pocillo ciego Neuroprobe de 48 pocillos (Gaithersburg, MD). De forma breve, los pocillos del fondo se llenaron con sobrenadantes de experimentos de migración (25  $\mu$ l), y se cubrieron con un filtro de policarbonato de 3  $\mu$ m de poro (Neuroprobe). Como controles positivos, se usaron LTB4 purificada (Sigma) o IL-8 (Peprotech, Rocky Hill, NJ). Los pocillos de la parte superior se llenaron con 50  $\mu$ l de células polimorfonucleares marcadas con calceína AM (1 x 10<sup>6</sup>/ml). Después de un período de incubación de 40 minutos a 37°C, las células que habían migrado hacia los compartimentos inferiores se cuantificaron con un fluorímetro (filtros de 485 de excitación/520 de emisión). Para inhibir la migración mediada por IL-8, se realizaron experimentos en presencia de 100  $\mu$ g/ml de mAb anti-IL-8 bloqueante (BD Biosciences). La migración mediada por LTB4 se investigó bloqueando los receptores LTB4 con 100  $\mu$ g/ml de mAb anti-BLTR1 (BD Biosciences). Adicionalmente, durante los experimentos de quimiotaxia, se añadió el antagonista del receptor LTB4 U75302 (10  $\mu$ M en etanol; Sigma).

#### Ejemplo 7: Ensayos inmunosorbentes ligados a enzimas

20 Se determinó LTB4 en sobrenadantes usando un kit de ELISA de R&D systems (Minneapolis, MN), mientras que IL-8 se determinó usando pares de anticuerpos coincidentes de Biosource (Nivelle, Bélgica). Para la determinación de lactoferrina, se usó como anticuerpo de captura anti-lactoferrina humana de conejo (Sigma), como anticuerpo de detección se usó anti-lactoferrina humana marcado con fosfatasa alcalina (MP Biomedicals, Eindhoven), y como sustrato cromógeno se usó fosfato de p-nitrofenilo.

#### Ejemplo 8: Ensayo de fagocitosis

25 Se mezclaron células polimorfonucleares con bacterias E. coli (cepa F1, cultivo nocturno e caldo líquido [Oxoid, Cambridge UK]; relación E:T 1:10) en presencia de BSA o IgA (1 mg/ml), y se incubaron a 37°C en un agitador giratorio (8 rpm) durante 30'. Las células se centrifugaron durante 8' a 150\*g. El sobrenadante se recogió y se centrifugó durante 10' a 15.000\*g, y se almacenó para el análisis posterior en ensayos de quimiotaxia. Las células se lavaron dos veces, y se obtuvieron preparaciones de centrifugado celular.

#### Ejemplo 9: Cuantificación del influjo de células polimorfonucleares en tejidos de pacientes.

30 A fin de determinar el influjo de granulocitos, se pueden tomar biopsias de tejido inflamado de pacientes. Estas biopsias se pueden procesar entonces para los análisis histológicos o inmunohistoquímicos como se conocen en la técnica. De forma breve, las biopsias se congelan instantáneamente o se fijan toda la noche en formalina tamponada con fosfato al 10% (paraformaldehído al 4%), se deshidratan en concentraciones crecientes de etanol, y se embeben en parafina. Entonces se cortan secciones y se tiñen con hematoxilina y eosina (H&E) para el análisis histológico. Las secciones se tiñen con anticuerpo monoclonal EG2 (Phadia, dilución 1:200), que detecta la proteína de los gránulos del eosinófilo ECP, o con un anticuerpo monoclonal contra la proteína de los gránulos de neutrófilo MPO (Dako, A390, dilución 1:8000), siguiendo un protocolo inmunohistoquímico estándar (Widegren et al., Respir Res. 2008; 9:15). Se cuenta los números de ECP positivas (eosinófilos) y MPO positivas (neutrófilos) en los tejidos, y se comparan con el número de granulocitos en tejidos de donantes sanos. Se hicieron fotografías tomadas al azar de tejidos usando una cámara a 10x en un procedimiento estándar con un tiempo de exposición fijo para todas las fotos como se describe (Floris S, et al. Brain 2004; 127:616-627). El influjo de células polimorfonucleares se cuantifica contando las células individuales. Los racimos acumulados de células se cuantificarán con el uso de un programa de análisis de imagen digital AnalySIS (Soft Imaging System GmbH, Münster, Alemania). Por medio de un umbral predefinido constante para componentes de color, para la cuantificación se usan áreas teñidas positivamente. Se concluye que una enfermedad se caracteriza por infiltración de células polimorfonucleares si se detecta un mayor número de células polimorfonucleares en comparación con el número de células en tejidos correspondientes de donantes sanos.

45 Como alternativa, en pacientes con inflamación pulmonar, el número de células se puede determinar en una muestra de lavado broncoalveolar (BAL) que se puede tomar durante broncoscopia de diagnóstico rutinaria (Babusyte A et al. Respir Res. 14 de noviembre de 2007; 8: 81). De forma breve, el broncoscopio (Olympus, USA) se ancla en el bronquio segmental del lóbulo medio, y se infunden 20 ml x 7 (en total 140 ml) de disolución salina estéril (NaCl al 0,9%). El fluido se filtró usando un stainer celular de 40  $\mu$ m (Becton Dickinson, USA), y se centrifugó a 4°C durante 10 min. Los números de células totales se determinaron usando el método de exclusión por exclusión del azul de tripano, después de lo cual se obtuvieron preparaciones de centrifugado celular. Los centrifugados celulares del BAL se tiñeron mediante el método de May-Grünwald-Giemsa estándar para recuentos celulares diferenciales. La diferenciación celular se determina contando 200 células en campos de visión al azar en un microscopio de luz. Las células se identificaron usando criterios morfológicos estándar, mediante morfología nuclear y granulación citoplásmica, o mediante tinciones inmunohistoquímicas como se describe anteriormente. Se concluye que la

inflamación pulmonar se caracteriza por infiltración de células polimorfonucleares si se detecta un mayor número de células polimorfonucleares en comparación con el número de células en BAL correspondiente de donantes sanos.

**Ejemplo 10: IgA induce activación y migración dirigida de células polimorfonucleares.**

5 Se observó migración de células polimorfonucleares hacia perlas de sefarosa revestidas con IgA tras 2 horas en un ensayo de cultivo tridimensional desarrollado para este fin y detallado en el Ejemplo 3. Sin embargo, no se observó migración hacia perlas revestidas con seroalbúmina bovina (BSA) o con IgG tras 2 horas, ni después de puntos de tiempo posteriores. Además, en un segundo ensayo de migración de cultivo tridimensional, se observó migración hacia perlas de nitrocelulosa revestidas con IgA, pero no hacia perlas de nitrocelulosa revestidas con BSA o con IgG. De este modo, IgA induce específicamente migración de células polimorfonucleares.

10 Después, se realizaron ensayos de registro de vídeo en tiempo real para visualizar con más detalle la migración de las células polimorfonucleares hacia dianas revestidas con inmunoglobulinas. En estos experimentos, las células polimorfonucleares se marcaron con el colorante fluorescente PKH67. Todos los experimentos se realizaron tanto con perlas de sefarosa como con perlas de nitrocelulosa, que produjeron resultados comparables. Por lo tanto, nos referiremos en lo sucesivo a perlas de IgG o de IgA (o perlas de BSA como control) sin distinguir entre sefarosa y nitrocelulosa. Las células polimorfonucleares no respondieron a perlas de BSA o a perlas de IgG, y las células polimorfonucleares todavía estuvieron inactivas después de 20 minutos, indicado por su forma redonda. Por el contrario, cuando se añadieron perlas de IgA, las células muy próximas a células polimorfonucleares adherentes se activaron en 5 minutos (reflejado por sus cuerpos celulares alargados), tras lo cual el frente de activación se extendió hacia las células vecinas. La cantidad de células unidas se cuantificó midiendo la fluorescencia después de que las células se hubieron lisado, lo que confirmó que sólo unas pocas células polimorfonucleares se unieron a perlas de BSA o de IgG, mientras que un gran número de células polimorfonucleares había migrado hacia y se había adherido a perlas de IgA (Fig. 2A). Se observaron resultados similares con diferentes concentraciones de inmunoglobulina o tras puntos de tiempo más largos. Además, las células polimorfonucleares se desgranularon después de unirse a perlas de IgA, reflejado por la liberación de lactoferrina (como componente de gránulos secundarios), pero no tras unirse a perlas de IgG o de BSA, indicando de ese modo que las células polimorfonucleares sólo se activaron tras unirse a perlas de IgA (Fig. 2B). No se observó diferencia en la capacidad de unión de las células polimorfonucleares a perlas de IgA o de IgG, lo que excluyó la posibilidad de que las diferencias en la activación y migración iniciadas por IgA frente a IgG fueron debidas a una adherencia más pobre de las células polimorfonucleares a perlas de IgG (Fig. 2C).

20 Para confirmar que el movimiento celular estaba dirigido específicamente hacia perlas de IgA, y no simplemente el resultado de una mayor quimiotaxis al azar, se realizaron experimentos de seguimiento celular. La posición de las células se determinó cada 7 segundos durante 20 minutos. En respuesta a las perlas revestidas con BSA o revestidas con IgG, las células polimorfonucleares no ganaron ninguna velocidad y sólo cubrieron una distancia aleatoria mínima. Sin embargo, en presencia de perlas de IgA, las células polimorfonucleares aumentaron rápidamente su velocidad tras la activación, y viajaron en la dirección de las perlas de IgA (Fig. 3). De este modo, IgA induce la migración dirigida de células polimorfonucleares.

**Ejemplo 11: La migración de células polimorfonucleares inducida por IgA in vivo está mediada a través de la interacción con CD89.**

40 Se han restringido estudios in vivo que investigan el papel de IgA, puesto que los ratones no expresan un homólogo de CD89 (van Egmond et al. Trends Immunol. 2001 (4): 205-11. Monteiro RC et al., Annu Rev Immunol. 2003; 21: 177-204). Para superar esta limitación, se crearon previamente ratones transgénicos (Tg) para CD89 humano, en los que el patrón de expresión de CD89, la regulación, la interacción con IgA humana, y la función imitan la situación humana (van Egmond M, et al., Blood. 1999 93 (12): 4387-94). Sin embargo, puesto que CD89 humano no interacciona muy bien con IgA murina, se inyectaron perlas revestidas con BSA o revestidas con IgA humana en la piel de ratones Tg CD89 o de ratones de la misma camada no Tg para investigar si IgA humana induce migración de células polimorfonucleares in vivo, y si este proceso depende de CD89. Se observó acumulación masiva de células polimorfonucleares en la piel de ratones Tg CD89, pero no en la piel de ratones de la misma camada no Tg tras la inyección de perlas revestidas con IgA. Sólo se observaron unas pocas células polimorfonucleares tras la inyección de perlas revestidas con BSA. De este modo, IgA induce migración de células polimorfonucleares in vivo, que depende de CD89.

**Ejemplo 12: La interacción de IgA con CD89 en células polimorfonucleares dispara la liberación de LTB4.**

55 Por lo tanto, la migración dirigida de células polimorfonucleares en respuesta a perlas revestidas con IgA sugirió la liberación de un estímulo quimiotáctico, y por lo tanto se ensayaron en un ensayo de quimiotaxia los sobrenadantes de experimentos de migración. Sólo los sobrenadantes de experimentos en los que las células polimorfonucleares habían migrado hacia perlas revestidas con IgA, pero no hacia perlas revestidas con BSA o con IgG, mostraron actividad quimiotáctica (Fig. 4A), que se redujo cuando los receptores LTB4 se bloquearon mediante adición de mAb anti-BLTR1 bloqueante o un antagonista del receptor (Fig. 4B). La adición de un mAb anti-interleucina 8 (IL-8) bloqueante no disminuyó la actividad quimiotáctica. Adicionalmente, se detectaron cantidades mínimas de IL-8, pero

abundantes cantidades de LTB4 en sobrenadantes de experimentos de migración (Fig. 4C), indicando de ese modo que IgA induce la liberación de LTB4, que es responsable de la migración de células polimorfonucleares observada.

### **Ejemplo 13: La fagocitosis de bacterias E. coli inducida por IgA dispara la migración de células polimorfonucleares**

5 Para imitar una situación más fisiológica, se investigó la respuesta migratoria tras la fagocitosis de bacterias E. coli, que están entre los habitantes más habituales de la flora intestinal. Sólo se observó fagocitosis mínima de bacterias E. coli revestidas con BSA por las células polimorfonucleares. Sin embargo, las bacterias E. coli revestidas con IgA fueron fagocitadas vigorosamente. Puesto que la actividad quimiotáctica aumentó en sobrenadantes, la fagocitosis de bacterias revestidas con IgA dio como resultado una liberación de estímulos quimiotácticos (Fig. 5). Debido a que  
10 IgA no es producida como molécula monómera en sitios mucosales, sino como molécula dímera, se investigó la capacidad de dIgA para inducir igualmente la migración de células polimorfonucleares. No se observó ninguna diferencia entre la capacidad para inducir la migración de células polimorfonucleares entre IgA sérica monómera o dIgA. De este modo, la fagocitosis de bacterias revestidas con IgA dio como resultado la migración de células polimorfonucleares, y tanto IgA monómera como dímera son igualmente capaces de inducir la migración de células  
15 polimorfonucleares.

### **Ejemplo 14: Síntesis peptídica**

Se sintetizaron péptidos mediante síntesis peptídica en fase sólida usando una resina 4-(2,4-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi (Rink-Amida) (BACHEM, Alemania) en un sintetizador Syro (MultiSynTech, Alemania). Todos los aminoácidos se adquirieron de BACHEM Biochemica GmbH (Heidelberg, Alemania) y se usaron como N- $\alpha$ -(Fmoc) protegido con funcionalidades de cadena lateral protegidas como grupos N-t-Boc (KW), O-t-Bu (DESTY), N-Trt (HNQ), S-Trt (C), SStBu (C), o N-Pbf (R). Se empleó un protocolo de acoplamiento usando un exceso de 6,5 veces de HBTU/HOBT/aminoácido/DIPEA (1:1:1:2) en NMP, con un tiempo de activación de 30 min. usando acoplamientos  
20 dobles. Los péptidos se escindieron de la resina mediante reacción con TFA (15 ml g<sup>-1</sup> resina) que contiene 13,3% (p) de fenol, 5% (v) de tioanisol, 2,5% (v) de 1,2-etanoditiol, y 5% (v) de milliQ-H<sub>2</sub>O durante 2-4 h a RT. Los péptidos brutos se purificaron mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones de fase inversa (RPC), bien en una columna "DeltaPack" (25 ó 40 x 100 mm de diámetro interno, tamaño de partículas de 15  $\mu$ m, tamaño de poros de 100 Å; Waters, U.S.A.) o en una columna C18 preparativa RP-18 "XTERRA" (50 x 4,6 mm de diámetro interno, tamaño de partículas de 2,5  $\mu$ m (Waters, U.S.A.), con un gradiente AB lineal de 1-2% de B min<sup>-1</sup>, en el que el disolvente A fue TFA al 0,05% en agua, y el disolvente B fue TFA al 0,05% en ACN. Los pesos moleculares de iones  
25 primarios corregidos de los péptidos se confirmaron mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización en un espectrómetro de masas Micromass ZQ (Micromass, Países Bajos) o un VG Quattro II (VG Organic, U.K.).

### **Ejemplo 15: Ensayos de bloqueo**

Se investigó el potencial bloqueante de anticuerpos anti-Fc $\alpha$ RI y/o sFc $\alpha$ RI y/o péptidos que imitan el sitio de unión a IgA en CD89 o el sitio de unión a CD89 en IgA usando un ensayo de migración de células polimorfonucleares bidimensional como se detalla en el ejemplo 4. Para ese fin, se incubaron células polimorfonucleares teñidas con PKH67 con diferentes concentraciones (que oscilan de 1-100  $\mu$ g/ml en RPMI) de anticuerpos bloqueantes anti-Fc $\alpha$ RI o con péptidos que imitan el sitio de unión a IgA en CD89, durante 20 minutos a 37°C. Las perlas revestidas con IgA se incubaron con diferentes concentraciones (que oscilan de 1-100  $\mu$ g/ml en RPMI) de péptidos que imitan el sitio de  
40 unión a CD89 en IgA, durante 20 minutos a 37°C. Las células polimorfonucleares teñidas con PKH67 (2,5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo) que no habían sido incubadas (como controles) o las células polimorfonucleares teñidas con PKH67 que se habían incubado con anticuerpos bloqueantes o péptidos se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos (Greiner). Se añadieron (10  $\mu$ l/pocillo) perlas revestidas con IgA no incubadas, o perlas revestidas con IgA que se habían incubado con péptidos. Las células se incubaron entonces durante 20' a 37°C, después de lo cual se recogieron suspensiones celulares y las perlas se lavaron 2 veces con PBS para eliminar las células polimorfonucleares teñidas con PKH67 no unidas. Las perlas se incubaron con un tampón que contiene 2,0 g/l de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 1,0 g/l de Tween 20, 2,0 g/l de BSA y 7,44 g/l de EDTA, en PBS, para lisar las células polimorfonucleares teñidas con PKH67 unidas. La fluorescencia se midió usando filtros con 485 de excitación y 520 de emisión (Fluostar Galaxy, BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania) para determinar el número de  
45 células polimorfonucleares que se habían unido a las perlas revestidas con IgA. El porcentaje de bloqueo se determinó usando la siguiente ecuación: 100 - (número de células unidas en situación de bloqueo/número de células unidas sin bloqueo x 100)%. Los resultados se muestran en la figura 6.

### **Ejemplo 16: Ensayo de unión a ligando.**

Como ligando, se usaron placas de 96 pocillos revestidas con IgA para evaluar la unión de células polimorfonucleares teñidas con PKH67 a IgA. Se revistieron placas de 96 pocillos durante toda la noche a 4°C con 100  $\mu$ l de IgA sérica humana (10  $\mu$ g/ml, ITK diagnostics BV) o con 100  $\mu$ l de BSA (10  $\mu$ g/ml, Roche, Mannheim, Alemania). Al día siguiente, las placas se lavaron dos veces con PBS + 1% de BSA. Se añadieron 2 x 10<sup>5</sup> células por pocillo de las placas revestidas. Tras la incubación durante 30-60 min. a 4°C, las placas se midieron directamente en un fluoriscan (Molecular probes) a 485 nm, y esta lectura se designó como entrada. A continuación,

las placas se lavaron para eliminar células no adherentes, hasta que la fluorescencia de los pocillos revestidos con BSA estuvo por debajo del nivel de fondo. Subsiguientemente, la adhesión de células polimorfonucleares teñidas con PKH67 a IgA se expresó como fluorescencia tras lavar la placa dividiendo entre la fluorescencia antes de lavar la placa (método adaptado de Braut-Boucher F et al, J Immunol Methods 1995; 178: 41-51). La capacidad de unión a ligando de células polimorfonucleares teñidas con PKH67 en ausencia de reactivos de bloqueo se ajustó a 100% (= ajuste de valor). La capacidad de unión a ligando de células polimorfonucleares teñidas con PKH67, en presencia de reactivos bloqueantes, se calculó en porcentajes en comparación con el ajuste de valor. Los resultados se muestran en la Figura 7.

#### **Ejemplo 17: Tinción mediante inmunofluorescencia de biopsias de colon**

Se fijaron secciones (6  $\mu\text{m}$ ) de biopsias de colon en acetona (10'). Los sitios de unión no específica se bloquearon mediante incubación con 5% de suero de cabra normal/suero de conejo normal en PBS, seguido de una incubación durante 1 hora con mezclas de 1) anti-IgA humana de conejo-FITC (DAKO, 1:20)/anti CD66b humano IgM de ratón (marcador de células polimorfonucleares) (Pharmingen, 1:300), 2) anti-IgA humana de conejo-FITC/anti-Fc $\alpha$ RI humano IgG1 de ratón (Serotec, 1:50), o 3) anti-CD66b humano IgM de ratón/anti-Fc $\alpha$ RI humano IgG1 de ratón. La tinción con IgA/CD66b (1) se completó mediante incubación con anti-IgM de ratón de conejo biotinilado (Zymed, 1:150)/estreptavidina-Alexa594 (Molecular Probes, 1:400), la tinción con IgA/Fc $\alpha$ RI (2) mediante incubación con anti-IgG1 de ratón de cabra-Alexa594 (Molecular Probes, 1:300), y la tinción con CD66b/Fc $\alpha$ RI (3) mediante incubación con anti-IgG1 de ratón de cabra-Alexa594 seguido de anti-IgM de ratón de conejo biotinilado y estreptavidina-Alexa488 (Molecular Probes, 1:400). Las secciones se lavaron en PBS entre las etapas de incubación, y se montaron en Vinol (medio de montaje, producción propia). La fluorescencia se determinó con un microscopio Leica DM6000.

La tinción de inmunofluorescencia mostró que estaba presente una abundante cantidad de IgA en la lamina propria de donantes sanos. Sin embargo, no se encontraron células positivas a Fc $\alpha$ RI, lo que es debido presumiblemente a la ausencia de antígenos en tejido de colon normal. Por el contrario, había un influjo masivo de células que expresan Fc $\alpha$ RI en tejido de colon de pacientes con colitis ulcerosa (UC), en los que la integridad epitelial está comprometida, lo que dará lugar a la formación del complejo IgA-antígeno. Además, este infiltrado de células inmunitarias positivo a Fc $\alpha$ RI consistió casi exclusivamente en células polimorfonucleares activadas. Puesto que se observó intracelularmente IgA, las células polimorfonucleares habían captado los complejos de IgA-antígeno, apoyando fuertemente que la migración de células polimorfonucleares mediada por IgA puede contribuir al reclutamiento de células polimorfonucleares en UC.

#### **Ejemplo 18: Ensayo de migración de piel humana**

Se colocó un injerto de piel mamaria de grosor completo (epidermis y dermis) en una cámara de incubación de tejidos ex vivo (método adaptado a partir de Oosterling, SJ et al. Ann Surg. 2008; 247 (1): 85-94). Se inyectaron intracutáneamente vía la dermis 5  $\mu\text{l}$  de perlas revestidas con IgA o con BSA (17,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), seguido de la adición de células polimorfonucleares marcadas con PKH-67 ( $4 \times 10^6$  células/pocillo) a los pocillos. Debido a la corta semivida de células polimorfonucleares tras el aislamiento, las células se suplementaron con IFN- $\gamma$  (300 unidades/ml; Boehringer Ingelheim, Alkmaar, Países Bajos). La piel se incubó toda la noche a 37°C. Se recogieron biopsias de la piel inyectada y se congelaron instantáneamente. Se analizaron secciones de biopsias con campo brillante y microscopía de fluorescencia.

El análisis mediante campo brillante de secciones de piel con un bajo aumento (4x) mostró la localización de las perlas revestidas con BSA y con IgA inyectadas. El análisis de los canales de FITC de la sección de piel con perlas revestidas con IgA reveló fluorescencia verde desde la parte superior de la dermis hasta la mitad de camino de la sección. Además, una superposición de las imágenes de campo brillante y de los canales de FITC mostró colocalización de fluorescencia verde y perlas revestidas con IgA, indicando migración de células polimorfonucleares a perlas revestidas con IgA. No se observaron perlas fluorescentes en secciones de piel con perlas revestidas con BSA, indicando que las células polimorfonucleares no migran a la piel en ausencia de IgA. Tanto el péptido PEO-45#7,8 como el péptido PEO-50#8,9, mAb MIP8a y sFc $\alpha$ RI (véase el ejemplo 20) fueron capaces de evitar completamente la migración de células polimorfonucleares a perlas revestidas con IgA.

#### **Ejemplo 19: Experimento de colitis**

Se cruzaron ratones monotransgénicos para CD89 con ratones monotransgénicos para IgA humana (ratones alfa1-KI, solicitud de patente US 2007/248601, a fin de crear ratones doblemente transgénicos CD89 x alfa-KI. Los ratones recibieron sulfato de dextrano sódico al 2,5% (DSS) en su agua de beber durante 7 días, lo que indujo colitis aguda (Castaneda FE et al. Gastroenterology. 2005; 129:1991-2008). Después de 7 días, los animales se sacrificaron y se tomaron biopsias del colon y se tiñeron en busca de la presencia de células polimorfonucleares como se describe en el ejemplo 5.

Se observaron pequeños racimos de células polimorfonucleares en ratones de tipo salvaje y alfa-KI (sin CD89). Sin embargo, se observó un influjo significativo de células polimorfonucleares a lo largo de todo el colon de un ratón

doblemente transgénico CD89 x alfa-KI, apoyando que la presencia de IgA y Fc $\alpha$ RI en estos ratones contribuye al reclutamiento de células polimorfonucleares en colitis.

**Ejemplo 20: Fc $\alpha$ RI soluble (sFc $\alpha$ RI)**

5 Se produjo una forma soluble de Fc $\alpha$ RI expresando el ADNc que codifica la parte extracelular de Fc $\alpha$ RI en 293T. El constructo de ADNc se generó usando el vector pMG que contiene Fc $\alpha$ RI de longitud completa como molde para PCR de mutagénesis dirigida al sitio, a fin de suprimir la región transmembránica y la cola intracelular. Esto dio como resultado un vector pMG que expresa sólo el ectodominio de Fc $\alpha$ RI. Este constructo se verificó mediante análisis de secuencia y se usó subsiguientemente para la transfección de células 293T usando Fugene. Se generaron transfectantes estables cultivando las células 293T con higromicina. La expresión con éxito de sFc $\alpha$ RI se verificó  
10 usando análisis de FACS intracelular de las células transfectadas, y el sobrenadante de estas células se analizó en busca de la producción de sFc $\alpha$ RI en un ensayo de unión a ligando de IgA-Fc $\alpha$ RI de competición.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Drug Discovery Factory BV  
 <120> MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO O PROFILAXIS DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS CRÓNICAS  
 15 <130> 040WO  
 <150> EP08157033  
 <151> 28/05/2008  
 <160> 12  
 <170> PatentIn version 3.5  
 20 <210> 1  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Péptido artificial seleccionado de la region Fc de IgA  
 <400> 1

Ser	Ser	Met	Val	Gly	His	Glu	Ala	Leu	Pro	Leu	Ala	Phe	Thr	Gln	Lys
1				5					10					15	
Thr															

<210> 2  
 <211> 18  
 30 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Péptido artificial: péptido del bucle EF (CD89 75-92)  
 <400> 2

ES 2 440 278 T3

Gly Arg Tyr Gln Ala Gln Tyr Arg Ile Gly His Tyr Arg Phe Arg Tyr

1 5 10 15

Ser Asp

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Péptido artificial; péptido del bucle CD (CD89 49 - 59)

<400> 3

Glu Ile Gly Arg Arg Leu Lys Phe Trp Asn Glu

1 5 10

10 <210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Péptido artificial

<400> 4

Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala

1 5

<210> 5

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 5

His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys

25 1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 440 278 T3

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 6

Cys Ser Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys

1 5 10 15

Cys

5 <210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Péptido artificial

<400> 7

Arg Glu Ile Gly Arg Arg Leu Lys Phe Trp Asn Glu Thr Asp Pro

1 5 10 15

<210> 8

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 8

Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Cys

1 5 10 15

Thr

20

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Péptido artificial

<400> 9

ES 2 440 278 T3

Gly Arg Tyr Gln Cys Gln Tyr Arg Ile Gly His Tyr Arg Phe Arg Tyr  
1 5 10 15  
Ser Asp

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 10

Leu Lys Phe Trp Asn Glu Thr Asp Pro  
1 5

10 <210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Péptido artificial

<400> 11

Ala Gln Ala Ile Arg Glu Ala Tyr Leu  
1 5

<210> 12

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 12

Tyr Arg Ile Gly His Tyr Arg Phe Arg  
1 5

25

**REIVINDICACIONES**

1. Compuesto seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos contra CD89, anticuerpos contra IgA, agentes que imitan péptidos derivados de CD89 y agentes que imitan péptidos derivados de IgA que bloquean la unión entre IgA y CD89, para uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedades inflamatorias del intestino (IBD).
- 5 2. Compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad inflamatoria del intestino se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.
3. Compuesto para uso según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el sitio de unión a IgA en CD89 está bloqueado.
4. Compuesto para uso según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el sitio de unión a CD89 en IgA está bloqueado.
5. Compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto es un anticuerpo.
- 10 6. Compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto es un péptido, preferiblemente un péptido sintético.

Figura 1

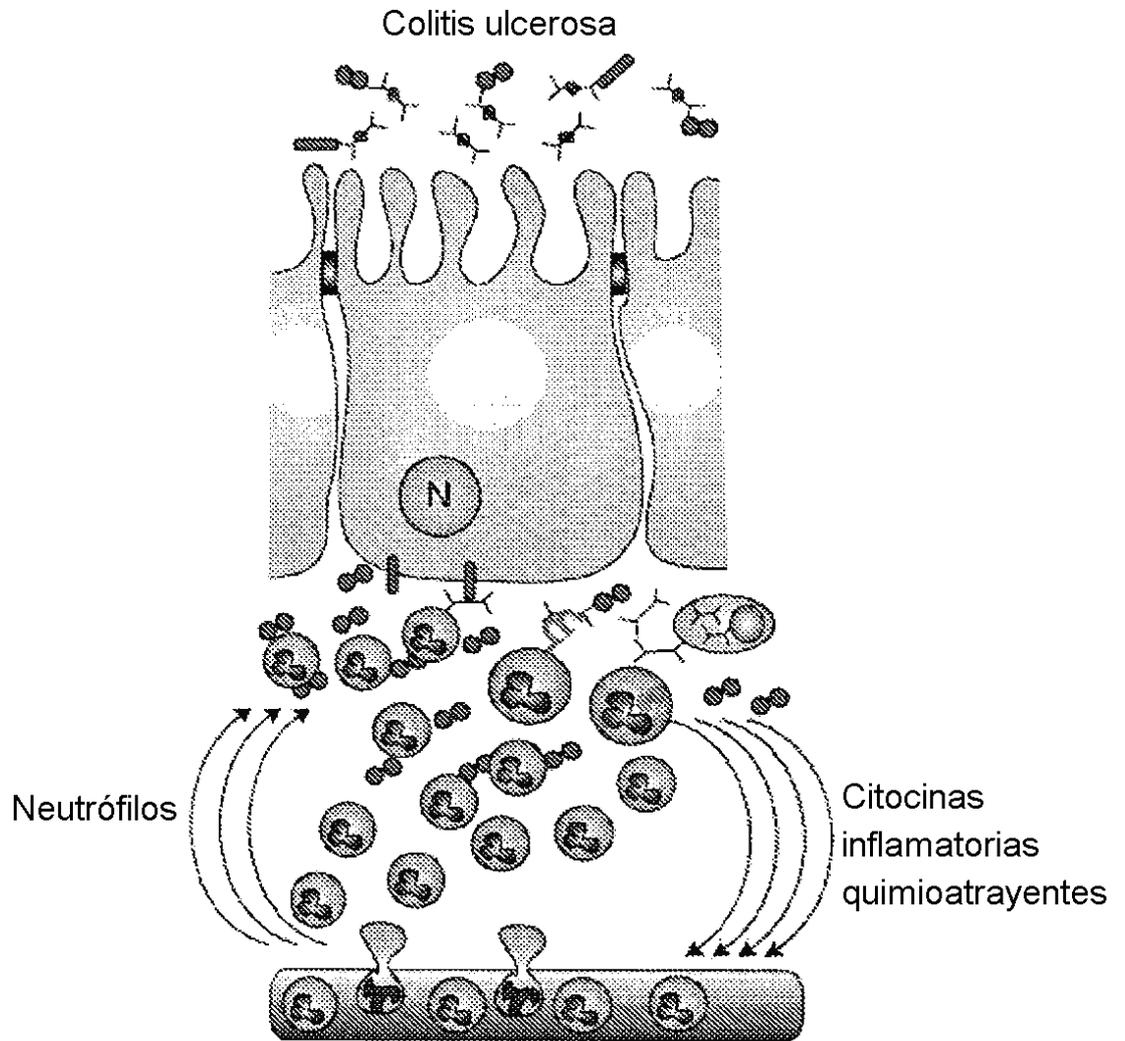


Figura 2A

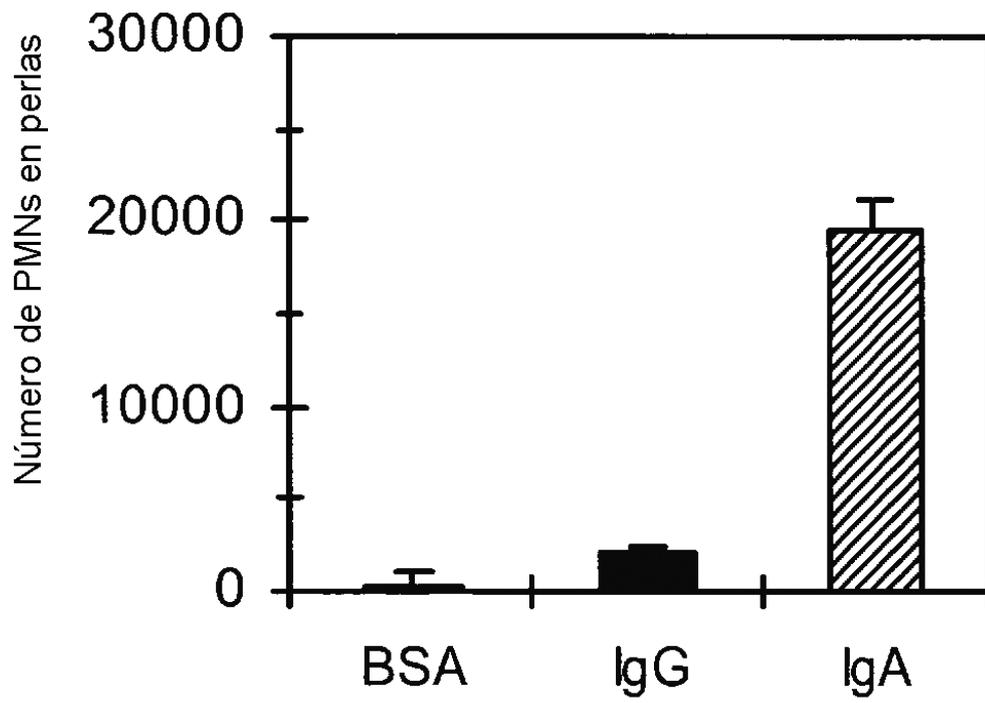


Figura 2B

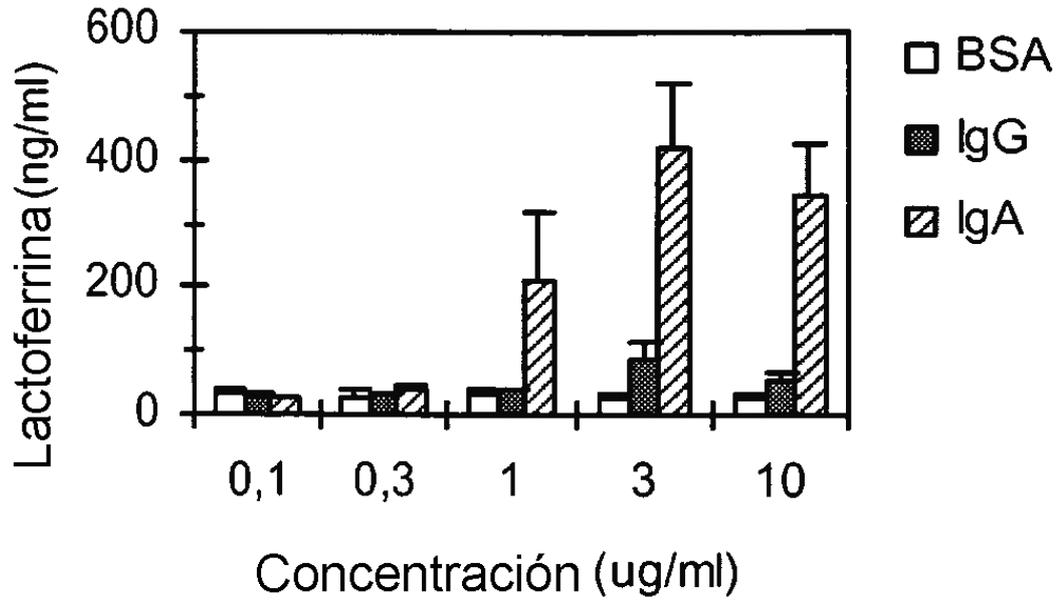


Figura 2C

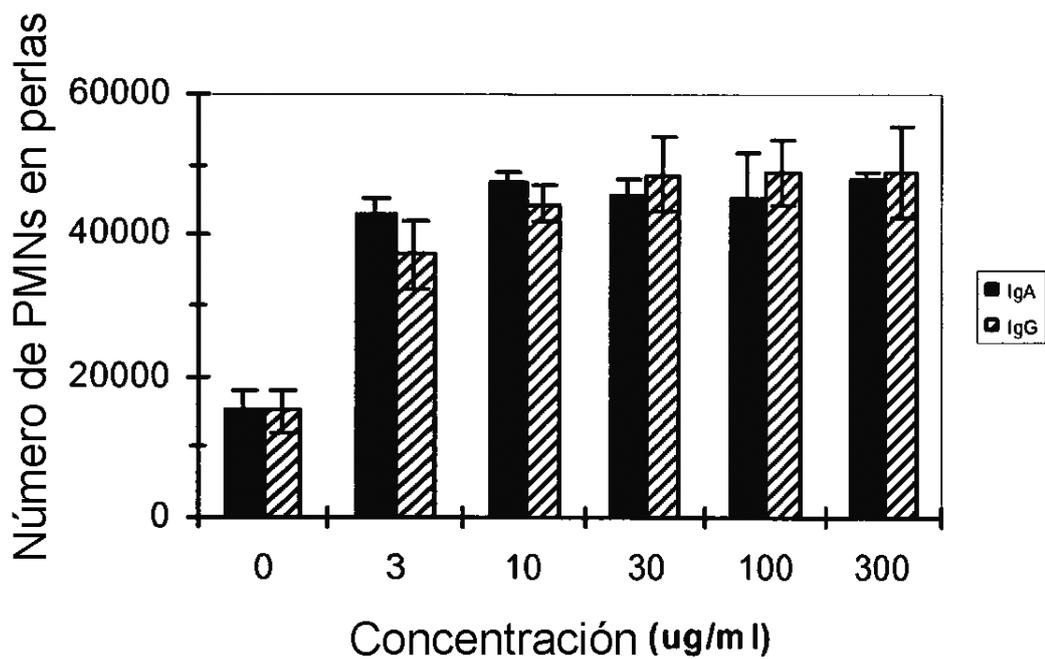


Figura 3A

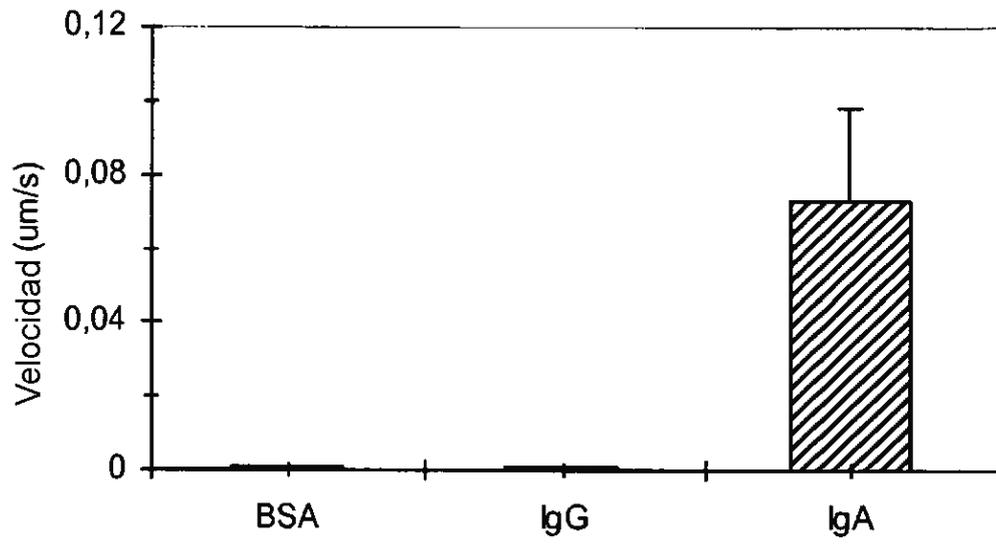


Figura 3B

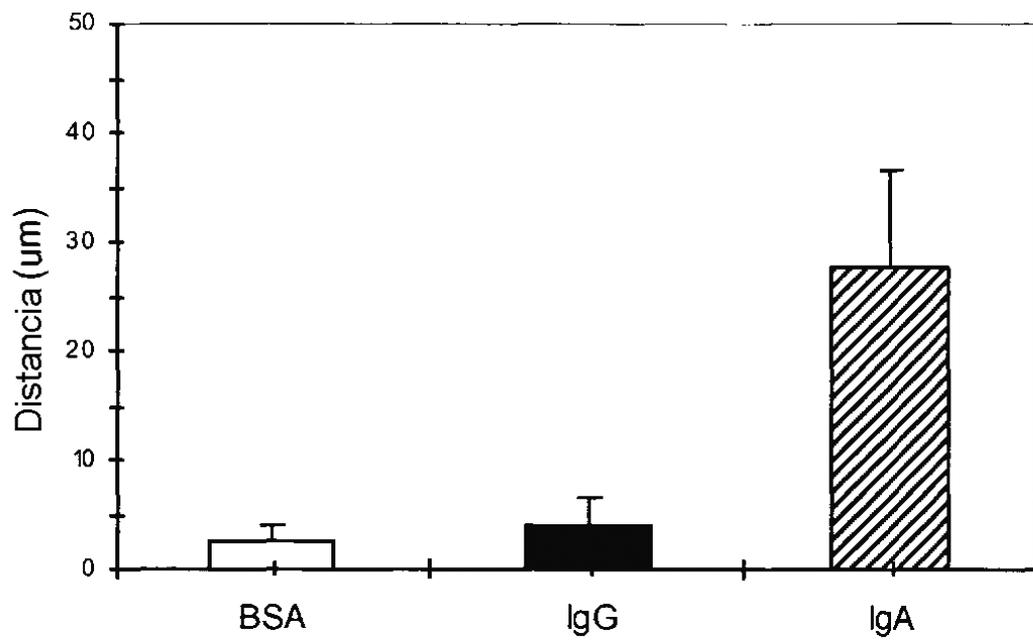


Figura 4A

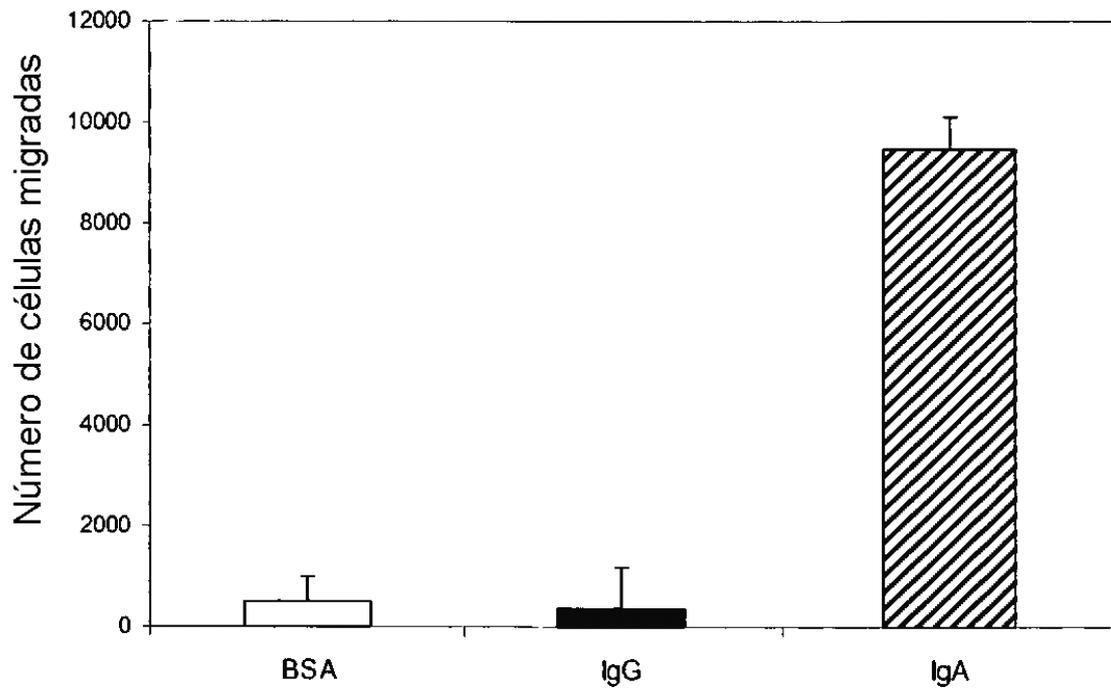


Figura 4B

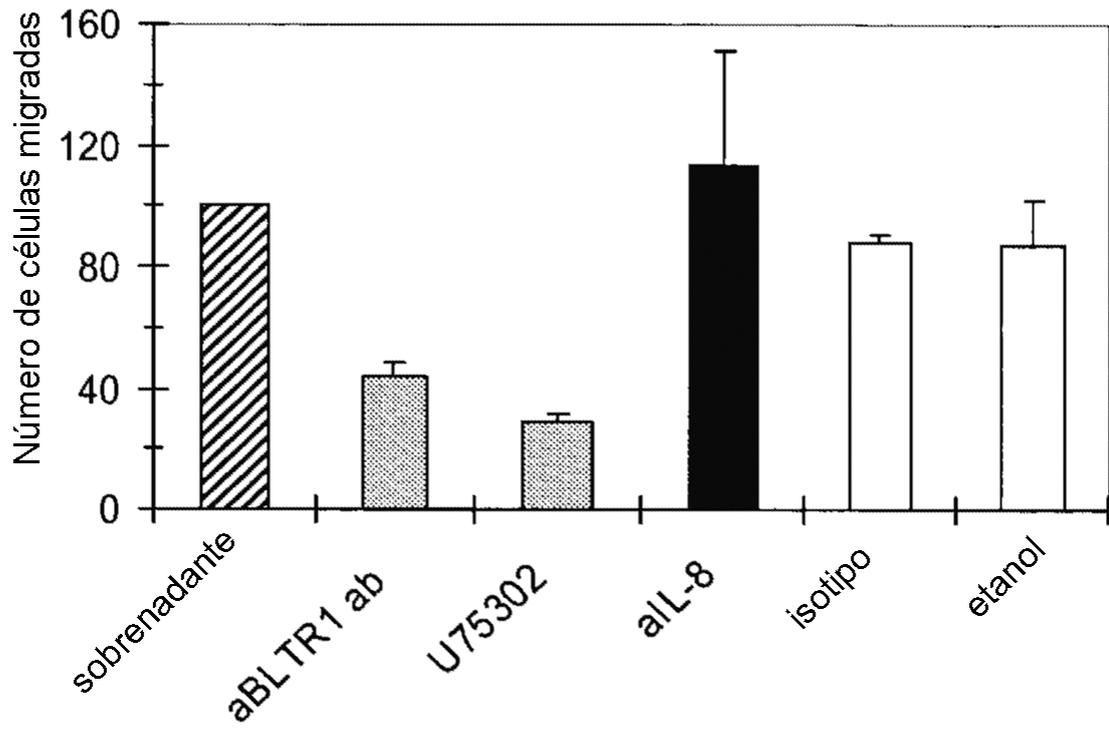


Figura 4C

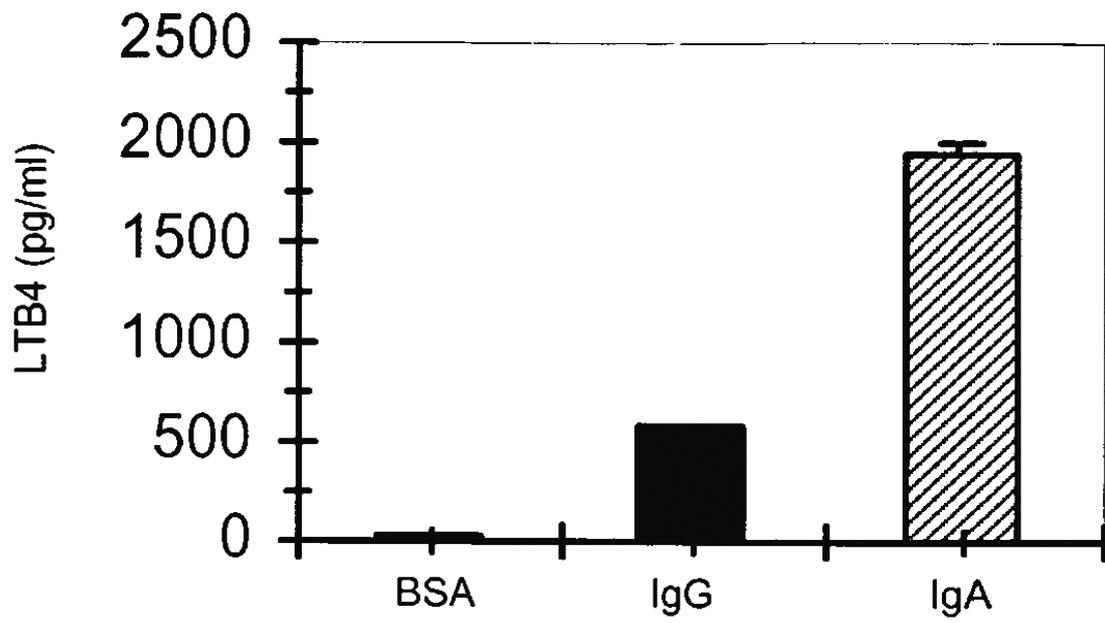


Figura 5

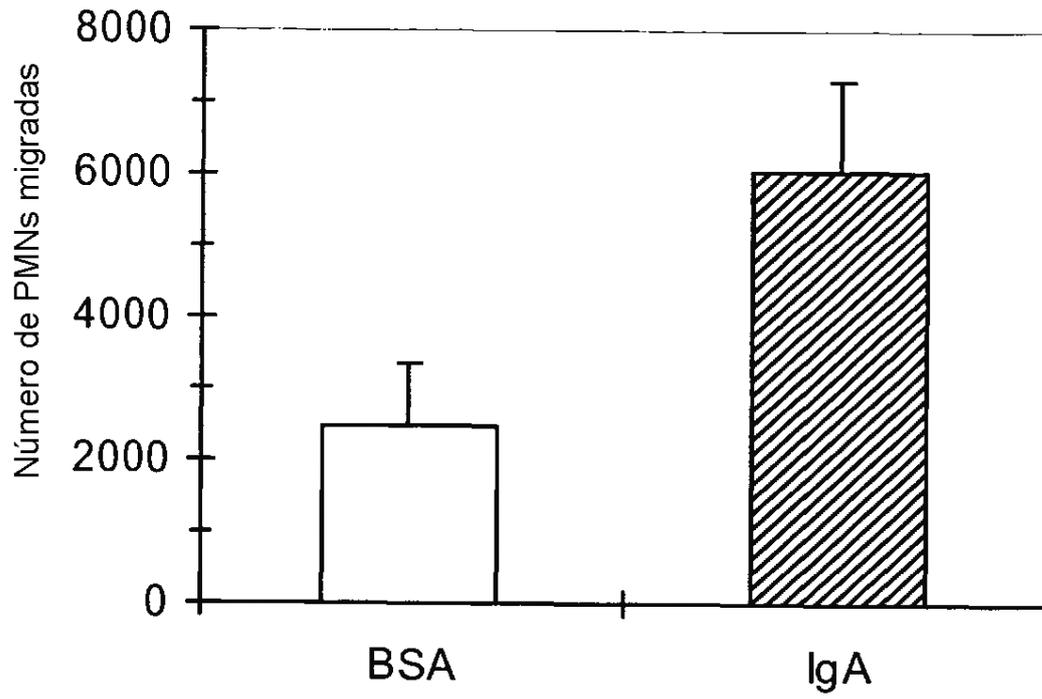


Figura 6

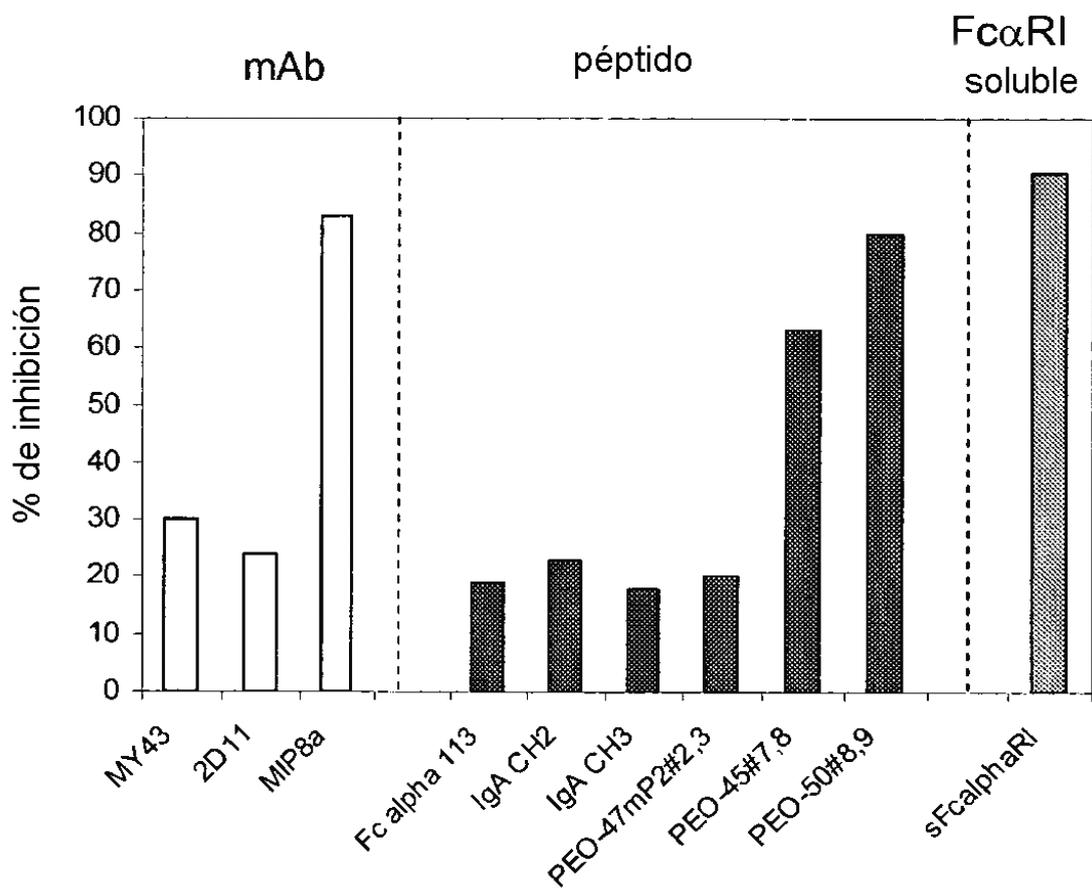


Figura 7

