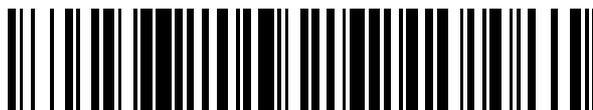


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 003**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/564** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2011 PCT/EP2011/055942**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO11141267**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2011 E 11714312 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2558861**

54 Título: **Procedimiento y medios para la identificación de sustancias que inhiben la producción de IgE**

30 Prioridad:  
**15.04.2010 DE 102010027827**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.01.2017**

73 Titular/es:  
**THORNE LIMITED (100.0%)  
773 Hornby Street  
Vancouver, V6Z1S4, CA**

72 Inventor/es:  
**JESSBERGER, ROLF y  
AUDZEVICH, DR., TATSIANA**

74 Agente/Representante:  
**ARPE FERNÁNDEZ, Manuel**

ES 2 597 003 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

Procedimiento y medios para la identificación de sustancias que inhiben la producción de IgE

- 5 [0001] La invención se refiere al ámbito de la investigación biomédica y farmacológica, en particular, en el área de la inmunología, las alergias y las enfermedades autoinmunitarias.

## ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 [0002] Las alergias, entre estas también el asma y las enfermedades autoinmunitarias, son afecciones muy extendidas y en aumento en todo el mundo, en lo que las alergias en los casos más graves pueden conducir a la muerte. La incidencia de las alergias se ha triplicado en los últimos 20 años. Entre el 5 y el 10 % de la población mundial padece alguna alergia, incluido el asma, padecido por una quinta parte de estas personas. El asma es la enfermedad crónica más frecuente en las personas menores de 18 años. Las alergias se originan por una  
15 producción excesiva de IgE por parte de los linfocitos B. Por lo tanto, la intervención en la regulación de esta producción de IgE abre en principio nuevas perspectivas para un tratamiento causal de las alergias, que hasta ahora no existía. Sin embargo, por el momento no se conoce suficientemente cómo se regula en detalle la producción de IgE.

20 Como se sabe desde hace tiempo, la producción de IgE depende de la función activadora de la transcripción de la proteína STAT-6. También se sabe que el efecto de STAT-6 sobre la producción de IgE es inhibido por BCL-6. BCL-6 y STAT-6 se unen a regiones solapantes de la secuencia de ADN regulador del gen IgE. Se supone que BCL-6 interacciona con correpresores y de este modo inhibe activamente la producción de IgE. Esta represión es específica para el gen IgE, ya que BCL-6 se une selectivamente a la región de unión de STAT-6 en el gen IgE y no se une a la mayoría de las otras regiones de unión de STAT-6. Sin embargo, los mecanismos exactos de  
25 especificidad y de regulación del equilibrio crítico entre BCL-6 y STAT-6 se desconocen.

- [0003] La proteína SWAP-70 se expresa fundamentalmente en las células B activadas, en mastocitos y en las células dendríticas, aunque no puede excluirse la presencia de esta proteína en el citoplasma de otros tipos celulares (Borggreve y col., 1998; Borggreve y col., 1999; Masat y col., 2000; Gross y col., 2002; Pearce y col., 2006; Ocana-Morgner y col., 2009). Se sabe que ratones deficientes en SWAP-70 presentan alteraciones fenotípicas  
30 especiales, por ejemplo, la activación mediada por CD40 de las células B, incluido el cambio a la producción de IgE, y la desgranulación de los mastocitos se encuentran fuertemente reducidas (Borggreve y col., 2001; Gross y col., 2002). En cuanto a la producción de IgE dependiente de SWAP-70, se ha demostrado que ratones deficientes en SWAP-70 presentan concentraciones de IgE fuertemente reducidas antes y después de la inmunización y que la producción de IgE secretada en cultivos de células B es aproximadamente ocho veces menor. Sin embargo, la  
35 producción de otras clases de inmunoglobulinas no resulta sustancialmente afectada.

- [0004] En el documento US 6.528.284 B1 (US2003/143611 A1) se trata la purificación y caracterización de proteínas que intervienen generalmente en el cambio de clase de las inmunoglobulinas. Se identificó SWAP-70, que aquí se designa y reivindica como SRTA-70 (*S-region transfer activity 70* o actividad de transferencia de la región S 70). Se describe su papel general en el cambio de clase de las inmunoglobulinas, así como la utilización de esta proteína en  
40 la modulación del cambio de clase.

- [0005] El documento US 2003/0166018 A1 describe el papel de SWAP-70 en la desgranulación de los mastocitos y reivindica un método para la identificación de un agente que reduce el contenido de la proteína SWAP-70 en un mastocito.

- [0006] En la actualidad, el tratamiento de las alergias tiene lugar fundamentalmente mediante un tratamiento sintomático, es decir, el alivio de la reacción alérgica, por ejemplo, con antihistamínicos o glucocorticoides, y no mediante un tratamiento causal. Las desventajas de los tratamientos anteriores son, entre otras, efecto de corta  
45 duración, no eliminan la causa, de efecto inespecífico y efectos secundarios.

- [0007] El único inhibidor de IgE conocido hasta el momento es omalizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante contra la inmunoglobulina E (anti-IgE) para el tratamiento del asma bronquial alérgico grave. Pero omalizumab no solo impide causalmente la producción de IgE, sino que más bien captura la IgE ya producida, con lo que se forman complejos de inmunoglobulina. Como desventaja, los mismos tratamientos con anticuerpos pueden desencadenar reacciones alérgicas o reacciones inmunitarias que atacan a la proteína anticuerpo. Además, la  
50 elaboración de anticuerpos es costosa desde el punto de vista farmacológico.

## OBJETIVO DE LA INVENCION

[0008] Por lo tanto, el objetivo de la invención es indicar un procedimiento que permita la selección específica de principios activos que puedan usarse como nuevos antialérgicos y que, en particular, inhiban la producción de IgE. Además, la invención deberá indicar medios para la realización del procedimiento de selección.

60

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0009] La invención se basa en el hecho conocido de que SWAP-70 regula positivamente la función de STAT-6 específicamente en la producción de IgE. En ausencia de SWAP-70, la producción de IgE está fuertemente

reducida, como los inventores han podido demostrar *in vitro* en un modelo de ratón. Por consiguiente, la inhibición terapéutica de SWAP-70 puede representar una vía importante para el tratamiento de las alergias.

[0010] Otro hecho conocido importante es que SWAP-70 regula negativamente la inhibición de la producción de IgE ejercida por BCL-6. En ausencia de SWAP-70, se une notablemente más BCL-6 a la región de ADN de IgE relevante, es decir, se inhibe la producción de IgE.

[0011] Los efectos de SWAP-70 sobre STAT-6 y BCL-6, así como sobre el equilibrio entre STAT-6 y BCL-6 crítico para la producción de IgE, eran desconocidos hasta ahora.

[0012] En resumen, puede concluirse que SWAP-70 regula positivamente la producción de IgE al desplazar la interacción de los dos antagonistas STAT-6 y BCL-6 con elementos reguladores del gen IgE a favor del activador STAT-6.

[0013] Los inventores han demostrado que SWAP-70 es un regulador de mayor relevancia de STAT-6 y BCL-6, específico para la producción de IgE en las células B, en el sentido de que refuerza el efecto de STAT-6 y antagoniza el efecto de BCL-6. Los inventores no han observado ninguna influencia de SWAP-70 sobre la expresión de otros genes que también se regulan mediante STAT-6 y/o BCL-6.

[0014] Sobre la base de estos hechos conocidos, la invención pone a disposición un procedimiento de selección que permite la identificación de nuevos principios activos que inhiben específicamente la producción de IgE.

[0015] Ventajosamente, la inhibición del efecto de SWAP-70 sobre STAT-6 es altamente específica para la producción de IgE en las células B. Esto permite desarrollar principios activos que traten las alergias y enfermedades autoinmunitarias dependientes de IgE de forma causal y no de forma sintomática como hasta ahora. Esto se consigue especialmente mediante principios activos que inhiben la función estimuladora de SWAP-70 sobre STAT-6.

[0016] El procedimiento según la invención de acuerdo con la reivindicación 1 comprende las etapas siguientes:

- (i) la puesta en contacto de:
  - (a) al menos una sustancia de prueba con
  - (b) SWAP-70 y
  - (c) BCL-6 y/o STAT-6,
- (ii) la determinación de la interacción de los componentes de unión *in vitro*, *in situ* o *in vivo*, en lo que en la medición de la interacción en vertebrados se excluyen los humanos,
- (iii) la selección de una sustancia de prueba que preferentemente inhibe específicamente la activación de STAT-6 mediada por SWAP-70 y/o refuerza la inhibición de STAT-6 mediada por BCL-6.

[0017] Preferentemente, en la etapa (iii) se selecciona una sustancia de prueba que refuerza la interacción de SWAP-70 con BCL-6 y/o la afecta de tal manera que se refuerza el efecto inhibitorio de BCL-6.

[0018] Alternativamente, se selecciona una sustancia de prueba que inhibe la interacción de SWAP-70 con STAT-6.

[0019] A este respecto, por interacción se entiende en cada caso preferentemente una interacción directa proteína-proteína o también una interacción indirecta, mediada por otras proteínas.

[0020] Preferentemente, se selecciona una sustancia de prueba que inhibe específicamente la activación de STAT-6 mediada por SWAP-70 y/o refuerza la inhibición mediada por BCL-6 de la activación de STAT-6 mediada por SWAP-70 o bien bloquea el efecto inhibitorio de SWAP-70 sobre BCL-6.

[0021] Preferentemente, las sustancias de prueba son las denominadas "moléculas pequeñas", es decir, compuestos con un peso molecular de hasta 800 Da (unidad de masa atómica). Preferentemente, las sustancias de prueba son moléculas orgánicas o también péptidos.

[0022] Preferentemente, la interacción de las proteínas SWAP-70, STAT-6 y/o BCL-6 y, en su caso, los elementos reguladores del gen IgE se mide *in vitro* o *in situ*.

[0023] *In vitro* (es decir, en un procedimiento acelular), el efecto de la(s) sustancia(s) de prueba sobre la interacción entre SWAP-70 y BCL-6 y/o entre SWAP-70 y STAT-6 (en lo que sigue, denominadas también componentes de unión) se determina preferentemente con el uso de las correspondientes proteínas purificadas como componentes de unión. Esto tiene lugar, por ejemplo, en ensayos de unión, en los que se mide la asociación entre un componente de unión marcado y otro sin marcar o entre dos componentes de unión marcados de forma diferente. Las pruebas de este tipo pueden realizarse, por ejemplo, en un procedimiento con pocillos múltiples (similar a la prueba ELISA) o en disolución (por ejemplo, por medio de AlphaScreen) con alto rendimiento. Los marcadores son, por ejemplo, colorantes fluorescentes que se unen covalentemente a uno o a los dos componentes de unión. Alternativamente, el marcado puede llevarse a cabo radiactivamente, con etiquetas de afinidad, heptámeros o con proteínas fluorescentes (preferentemente como proteínas de fusión, por ejemplo, GFP). Se determina la permanencia de las señales fluorescentes en el componente sin marcar o la interferencia de fluorescencia entre los componentes asociados.

[0024] *In situ* (es decir, en células, preferentemente en cultivo celular), el efecto de la(s) sustancia(s) de prueba sobre la interacción entre SWAP-70 y BCL-6 y/o entre SWAP-70 y STAT-6 se mide preferentemente en células que expresan SWAP-70 y BCL-6 y/o SWAP-70 y STAT-6. En este caso, la detección de la interacción entre los componentes de unión SWAP-70 y BCL-6 y/o entre SWAP-70 y STAT-6 tiene lugar preferentemente en lisados celulares. También en este caso, el marcado de los componentes de unión individuales (SWAP-70, BCL-6 y/o STAT-6) se lleva a cabo mediante etiquetas de afinidad (por ejemplo, His-tag) y los correspondientes materiales de unión por afinidad (como, por ejemplo, Ni<sup>2+</sup>) unidos a estos materiales.

El efecto de sustancias de prueba que penetran en las células afecta a los componentes de unión de manera similar a la descrita anteriormente en los métodos *in vitro*. Preferentemente, los procedimientos *in situ* se realizan con líneas celulares habituales, fáciles de cultivar y transfectar, en las que se expresan los componentes de unión. Las líneas

- celulares adecuadas son, por ejemplo, NIH3T3, 293T y COS-7. Ventajosamente, las interacciones entre los componentes de unión pueden analizarse también en sistemas celulares no de mamíferos, por ejemplo, en células de levadura (sistema de dos híbridos de levaduras) o células de insectos (coprecipitación tras expresión) o después de una cotraducción en sistemas acelulares (sistemas de transcripción/traducción *in vitro*, seguidos de coprecipitaciones, denominadas de arrastre molecular o *pull down*). Como controles negativos se usan preferentemente las correspondientes células o líneas celulares en las que los genes codificantes de alguna de estas proteínas están ausentes o han sido delecionados (por ejemplo, células de ratones SWAP-70<sup>-/-</sup> como, por ejemplo, fibroblastos embrionarios de ratón). Los formatos de pocillos múltiples posibilitan procedimientos de selección de gran rendimiento. Alternativamente, la detección de la interacción de los componentes de unión *in vitro* o también en células puede llevarse a cabo mediante análisis de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Para ello, dos de los componentes de unión (preferentemente SWAP-70 y BCL-6 o alternativamente SWAP-70 y STAT-6) se marcan preferentemente con dos moléculas diferentes entre sí, adecuadas para la generación de una FRET. Estas dos moléculas diferentes entre sí se denominan también a continuación donante de FRET y aceptor de FRET o también simplemente (donante y aceptor).
- [0025] La transferencia de energía de resonancia de Förster (abreviado FRET) es un proceso físico en el que la energía de un donante excitado puede transferirse sin radiación a un aceptor a una distancia de aproximadamente 1,5 a 10 nm. Para ello, las moléculas se eligen de tal manera que el espectro de emisión de la molécula donante solape con el espectro de excitación del aceptor. Si tanto el donante como el aceptor son colorantes fluorescentes, se habla de una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Si, por el contrario, el donante o el aceptor es una fuente de quimioluminiscencia o de bioluminiscencia, se usan los términos transferencia de energía de resonancia de quimioluminiscencia (CRET) o transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET).
- [0026] Para los ensayos *in vitro*, el donante y/o el aceptor se unen preferentemente a los componentes de unión covalentemente o por coordinación. El marcado de la proteína se lleva a cabo preferentemente de forma covalente en grupos amino o en grupos carboxilo libres de las cadenas laterales de los aminoácidos (restos de lisina, aspartato o glutamato) de la proteína. Preferentemente, en la invención se usan como donantes y aceptores colorantes fluorescentes orgánicos o inorgánicos. Preferentemente se unen de una a 40, con especial preferencia de una a cinco moléculas de colorante por molécula de proteína. Como colorantes fluorescentes inorgánicos se usan, por ejemplo, europio (preferentemente Eu<sup>3+</sup>), cerio o terbio o los denominados puntos cuánticos como, por ejemplo, nanopartículas dotadas de LaF<sub>3</sub> y LaPO<sub>4</sub>.
- [0027] La unión de una biomolécula, como las proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP, YFP y CFP) y/o la luciferasa tiene lugar por entrecruzamiento o mediante la formación de una proteína de fusión. Ventajosamente, las proteínas de fusión con este tipo de biomoléculas permiten también la detección de la interacción de los componentes de unión *in situ* (en la célula). Las fuentes de luminiscencia (como la luciferasa) y las proteínas fluorescentes pueden emplearse ventajosamente como aceptores y donantes.
- [0028] Como alternativa a las células, pueden emplearse también organismos pluricelulares. En este caso, la interacción de los componentes de unión se determina preferentemente *in vivo*. Otros organismos pluricelulares se eligen entre los vertebrados (con excepción de los humanos) y los invertebrados, como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, medaka, pez cebra o *Mus musculus* o sus embriones.
- [0029] Las parejas de donantes y aceptores preferidas y sus máximos de excitación (Max<sub>ex</sub>) y máximos de emisión (Max<sub>em</sub>) se eligen entre:

Donante			Aceptor		
Denominación	Max <sub>ex</sub>	Max <sub>em</sub>	Denominación	Max <sub>ex</sub>	Max <sub>em</sub>
Alexa Fluor 488	495 nm	519 nm	Alexa Fluor 555 (o también Alexa Fluor 546 o 568)	555 nm	565 nm
Alexa Fluor 546	556 nm	573 nm	Alexa Fluor 633	632 nm	647 nm
Alexa Fluor 555	555 nm	565 nm	Alexa Fluor 647	650 nm	668 nm
Alexa Fluor 568	578 nm	603 nm	Cy5	649 nm	670 nm
Alexa Fluor 568 (o también Cy3)	578 nm	603 nm	Alexa Fluor 633 (o también Cy5 o Alexa Fluor 647)	632 nm	647 nm
Europio (Eu <sup>3+</sup> )	395 nm 466 nm	617 nm	Alofococianina	650 nm	660 nm
Eu <sup>3+</sup> (o LaF <sub>3</sub> )	395 nm	591 nm	Alexa Fluor 594 (o también Alexa Fluor 610 o 633)	590 nm	630 nm
LaPO <sub>4</sub> (o Ce o Tb)	266 nm	542 nm	Alexa Fluor 532	530 nm	560 nm
Proteína fluorescente cian (CFP)	452 nm	505 nm	Proteína fluorescente amarilla (YFP)	514 nm	527 nm
Luciferasa			YFP	514 nm	527 nm
EGFP	488 nm	509 nm	YFP	514 nm	527 nm

[0030] Los análisis de FRET también son adecuados para la selección con gran rendimiento. A uno de los componentes de unión se une un donante de FRET y al otro un aceptor de FRET, en lo que los dos forman

conjuntamente una pareja de FRET. Si los dos componentes de unión se encuentran independientes entre sí *in vitro* o en la célula, no se genera ninguna FRET. A través de la interacción de los dos componentes de unión, el donante de FRET y el aceptor de FRET se sitúan en proximidad inmediata, con lo que se genera la FRET.

Debido a la FRET, la emisión de radiación y la duración de la fluorescencia del donante disminuyen, a la vez que aumenta la emisión del aceptor. Esto resulta en un desplazamiento medible de la longitud de onda de la luz emitida en la interacción de los componentes de unión, que puede detectarse mediante los métodos instrumentales adecuados. Para este fin son adecuados, por ejemplo, el microscopio de fluorescencia, el citómetro de flujo, el fluorímetro o el espectrofotómetro de placas.

[0031] Las sustancias de prueba afectan a la interacción de los componentes de unión. Preferentemente se seleccionan sustancias de prueba que reducen la interacción de SWAP-70 con STAT-6 y/o reducen la interacción de SWAP-70 con BCL-6.

[0032] Los inventores han demostrado mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) que, en células B estimuladas con IL-4, SWAP-70 se une junto con STAT-6 y BCL-6 a la región promotora del gen IgE (promotor  $\epsilon$ ) (véanse las figuras 4A y 4B), pero no a la región promotora del gen IgG1 (promotor  $\gamma$ 1). De este modo, SWAP-70 regula la transcripción específica dependiente de STAT-6 en el promotor  $\epsilon$ .

[0033] Preferentemente, la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de uno o más elementos reguladores del gen IgE, a los que se unen tanto STAT-6 como BCL-6. Estos elementos reguladores son secuencias de ADN que preferentemente están en forma bicatenaria y contienen el promotor  $\epsilon$  y/o las secuencias siguientes:

Promotor  $\epsilon$  GLT:

[0034]

5'...CCCACTGTGCCTTAGTCAACTTCCCAAGAACAGAATCAAAAGGGAACTTCCAAG

GCTGCTAAGGCCGGGGTTCCCACCCCACTTTTA... 3 (SEQ ID NO 1)

[0035] La región de unión de STAT-6 está subrayada. Se encuentra entre las posiciones -111 y -102 con respecto al inicio de la transcripción GLT de  $\epsilon$ . La secuencia -111/-102 es también una de al menos dos regiones de unión de BCL-6.

La segunda región de unión de BCL-6 se encuentra entre las posiciones -157 y -149:

[0036] Secuencia: 5'...TGTCTCCTAGAAAGAGG...3' (SEQ ID NO 2).

La región de unión de BCL-6 está subrayada.

[0037] Preferentemente, los elementos reguladores usados en la invención contienen las secuencias SEQ ID NO 1 y 2.

[0038] Preferentemente, en la etapa (iii) se selecciona una sustancia de prueba que desplaza la interacción de los dos antagonistas STAT-6 y BCL-6 con elementos reguladores del gen IgE a favor de BCL-6.

[0039] SWAP-70 controla la unión de BCL-6 y STAT-6 a elementos reguladores del gen IgE. Esta unión se reproduce preferentemente *in vitro*, preferentemente en un ensayo de retardo de la movilidad electroforética EMSA (también denominado ensayo de retardo en gel o de retardo de banda) o en variantes de alto rendimiento del mismo. Aquí se ensaya la unión a los elementos reguladores del gen IgE (es decir, oligonucleótidos que preferentemente se eligen como anteriormente), por ejemplo, en un formato de pocillos múltiples. El efecto de la sustancia de prueba sobre la unión mediada por SWAP-70 de STAT-6 y/o BCL-6 puede detectarse a través de la asociación de los correspondientes componentes de unión marcados (SWAP-70, BCL-6 y/o STAT-6) con los oligonucleótidos. En ello, los oligonucleótidos están preferentemente fijados a un material de soporte. Alternativamente, se marcan los oligonucleótidos y uno de los componentes de unión se fija a un material de soporte.

[0040] Las sustancias de prueba determinadas con el procedimiento según la invención se ensayan preferentemente en cuanto a su eficacia biológica, es decir, la inhibición de la producción de IgE. Para ello, preferentemente se estimulan linfocitos B *in situ* o *in vivo* para la producción de IgE. A este respecto, preferentemente se usan células aisladas del bazo (por ejemplo, de ratón), ya que estas contienen una gran cantidad de linfocitos B. A estos efectos, los linfocitos B no tienen que purificarse. Los linfocitos B pueden estimularse para la producción de IgE mediante IL-4 (preferentemente murina y, por ejemplo, preparada por tecnología recombinante) y CD40L (por ejemplo, mediante células fijadas que expresan CD40L). La producción de IgE puede medirse sencillamente y con gran rendimiento por medio de análisis FACS o ELISA. Preferentemente se seleccionan sustancias de prueba que reducen la producción de IgE.

[0041] Preferentemente, para analizar el mecanismo de acción de las sustancias de prueba, se lleva a cabo una coimmunoprecipitación de SWAP-70 con BCL-6 o con STAT-6 de células B estimuladas para la producción de IgE como se describe en el párrafo anterior y puestos en contacto con una sustancia de prueba. Mediante la coimmunoprecipitación puede determinarse cómo afecta la sustancia de prueba a la interacción de SWAP-70 con BCL-6 y/o STAT-6. Si la sustancia de prueba inhibe la interacción de SWAP-70 con STAT-6, ambas proteínas coprecipitarán en menor cantidad. Si la sustancia de prueba refuerza la interacción de SWAP-70 con BCL-6, ambas proteínas coprecipitarán en mayor cantidad.

[0042] Una variante muy ventajosa es la inmunoprecipitación de cromatina. De este modo, puede determinarse la interacción de SWAP-70, BCL-6 y/o STAT-6, preferentemente de las tres proteínas, con elementos reguladores del gen IgE en la célula, es decir, con material de gran importancia *ex vivo*, o bien el efecto de la sustancia de prueba sobre esta interacción.

[0043] Las sustancias identificadas mediante el procedimiento según la invención son adecuadas especialmente para el tratamiento de alergias mediadas por IgE, en particular para el tratamiento de reacciones alérgicas dependientes de IgE o alergias de tipo I y de enfermedades autoinmunitarias dependientes de IgE. Las sustancias identificadas en el procedimiento según la invención son adecuadas especialmente para el tratamiento de enfermedades dependientes de IgE como el asma alérgico, la rinitis alérgica, la conjuntivitis alérgica, reacciones alérgicas del tubo digestivo (en particular, vómitos y diarrea), neurodermitis, psoriasis, eczemas de contacto, urticaria, edemas alérgicos, en particular el edema de laringe y el angioedema (edema de Quincke), choque anafiláctico, vasculitis alérgica, angitis o granulomatosis (síndrome de Churg-Strauss), síndrome de hiper-IgE, síndrome de Omenn, algunas formas del síndrome 22q11, de la artritis reumatoide, del lupus eritematoso, de la diabetes de tipo I, del síndrome de Sjogren y del penfigoide ampolloso.

[0044] También es objeto de la invención un kit de prueba de acuerdo con la reivindicación 7 para la identificación de una sustancia (sustancia de prueba) que inhibe la producción de IgE, que contiene:

- (a) SWAP-70 y
- (b) BCL-6 y/o STAT-6
- (c) en su caso, elementos reguladores del gen IgE.

[0045] Para los ensayos *in vitro*, los componentes (a) y (b) se encuentran respectivamente como proteínas aisladas y el componente opcional (c) como ADN aislado.

[0046] Preferentemente, como se describe anteriormente, las proteínas y el ADN se encuentran unidos a un material de soporte o incluyen un marcador.

[0047] Para los ensayos *in situ* o *in vivo*, todos los componentes (es decir, (a), (b) y en su caso (c)) se encuentran preferentemente en una célula o en un organismo pluricelular (con excepción de los humanos).

[0048] En este caso, las proteínas (es decir, los componentes (a) y (b)) incluyen un marcador, como se describe anteriormente, que se elige preferentemente entre etiquetas de afinidad, heptámeros y biomoléculas fluorescentes o quimioluminiscentes. Aquí el marcado tiene lugar preferentemente mediante la expresión como proteína de fusión (proteína + marcador).

[0049] Preferentemente, como se describe anteriormente, se eligen dos marcadores que son adecuados para la generación de una transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).

[0050] A continuación, la invención se explica más detalladamente mediante figuras y ejemplos, sin limitarla a los mismos:

La figura 1 demuestra que la estimulación con IL-4 activa la cinasa JAK1 tanto en las células B naturales como en las *Swap-70<sup>-/-</sup>* (figuras 1A, 1B) y que STAT-6 se activa asimismo tanto en las células B naturales como en las *Swap-70<sup>-/-</sup>* (figuras 1C, 1D, 1E). IFM = Intensidad de fluorescencia media.

Las figuras 2A y 2B muestran la reducción de la acumulación de STAT-6 en células B *Swap-70<sup>-/-</sup>* en extractos nucleares de las células B activadas con IL-4. C = extracto citoplásmico; N = extracto nuclear; min = estimulación en minutos. La figura 2C muestra la extracción de STAT-6 de núcleos de células B activadas con IL-4 con concentraciones de sal (sulfato de amonio) crecientes escalonadamente. SMC3 y SWAP-70 sirven como proteínas de comparación. A partir de núcleos celulares de células B *Swap-70<sup>-/-</sup>* puede extraerse notablemente menos STAT-6 de alta afinidad de unión, es decir que se eluya a alta concentración de sal (muestras 200 mM). Sp1 = factor de transcripción Sp1.

La figura 3 (microscopía de fluorescencia) demuestra que la localización general de STAT-6 en los núcleos celulares no se ve afectada. Arriba: STAT-6; abajo: coloración de los núcleos celulares con DAPI; centro: células *Swap-70<sup>-/-</sup>* identificadas con GFP. Las células naturales y *Swap-70<sup>-/-</sup>* se encuentran aquí yuxtapuestas.

Las figuras 4A y 4B muestran los resultados de una inmunoprecipitación de cromatina con anti-STAT-6 (a-STAT-6), anti-SWAP-70 (a-S-70), IgG (control) y anti-BCL-6 (a-BCL-6) después de la estimulación con IL-4, tanto en las células B naturales (wt) como en las *Swap-70<sup>-/-</sup>* (ko). *Input* = material de partida de cromatina. Los resultados demuestran que, en ausencia de SWAP-70, se incorpora notablemente más BCL-6 y notablemente menos STAT-6 al promotor I<sub>ε</sub>, así como que SWAP-70 se incorpora al promotor I<sub>ε</sub> de manera esencialmente independiente de la estimulación con IL-4. La figura 4B representa la cuantificación de estos resultados.

La figura 5 demuestra que BCL-6 se expresa aproximadamente en la misma medida en las células B naturales (wt) y en las *Swap-70<sup>-/-</sup>*. La figura 5A muestra un análisis de FACS de células B estimuladas con IL-4 (B220+) con respecto a la expresión de BCL-6. La figura 5B muestra el análisis del ARNm de BCL-6 por medio de RT-PCR semicuantitativa. En cada caso se comparan entre sí células naturales y *Swap-70<sup>-/-</sup>* con y sin estimular con IL-4 o bien preparaciones de su ARNm, en relación con el control de carga HPRT.

La figura 6 muestra un esquema de la regulación mediada por SWAP-70 de la producción de IgE por efecto del equilibrio entre STAT-6 y BCL-6. A: situación en las células B después de la estimulación con IL-4. B: posibles puntos de acción de la inhibición farmacológica, representados por símbolos de inhibición gruesos. La supresión del bloqueo de BCL-6 dependiente de SWAP-70 refuerza el efecto inhibitorio de BCL-6 sobre la producción de IgE. La supresión de la estimulación de STAT-6 dependiente de SWAP-70 reduce el efecto estimulador de STAT-6 sobre la producción de IgE.

## MATERIALES Y MÉTODOS

[0051] Aislamiento de las células: Las células B se aislaron del bazo de ratones naturales (wt) o ratones *Swap-70<sup>-/-</sup>* (C57BL/6 de cuatro a ocho semanas de edad) con métodos estándar y selección negativa con perlas MACS (Miltenyi Biotec). Las células B o las células esplénicas totales (0,3-0,5 x 10<sup>6</sup> células/ml) se cultivaron en presencia

de 1,6 a 3 ng/ml de IL-4 (del sobrenadante de un cultivo de células X63-IL-4). Cuando se indica, las células se cultivaron sobre un tapiz de fibroblastos L47, que expresan CD40L en su superficie.

[0052] Citometría de flujo: La detección por citometría de flujo se llevó a cabo por métodos estándar con anticuerpos anti-CD40R de ratón-PE, anti-IgE de ratón-FITC (R35-72), anti-IgG1 de ratón-PE (A85-1), anti-CD45RB220 de ratón-PE (RA3-6B2), CD45R/B220-PerCP (RA3-6B2) (BD Biosciences) o anti-IL-4R de ratón biotinilado (R&D Systems). La producción superficial de Ig se midió después de un lavado de arrastre (1 min, NaCl 85 mM, KCl 5 mM, EDTA 10 mM, NaCH<sub>3</sub>COO 50 mM, pH 4,0); para la coloración se usó fosfo-STAT-6 con anti-fosfo-STAT-6 de ratón (Y641)(J71-773.58.11) (BD Biosciences) después de la permeabilización de las células (metanol al 90 %).

[0053] RT-PCR en tiempo real: La detección de la transcripción del ARNm de IgG1 o de IgE se llevó a cabo en células esplénicas estimuladas con CD40L/IL-4 o bien en células B aisladas mediante RT-PCR en tiempo real. Como estándar se midió la expresión del ARNm de GAPDH.

Cebadores usados para la PCR:

Nombre	Secuencia	Longitud del producto	SEQ ID NO
GLTy1 Fwd	5'-TCGAGAAGCCTGAGGAATGT-3'		3
GLTy1 Rev	5'-ATAGACAGATGGGGGTGTCTG-3'	100 pb	4
GLTε Fwd	5'-CTGGCCAGCCACTCACTTAT-3'		5
GLTε Rev	5'-CAGTGCCTTTACAGGGCTTC-3'	100 pb	6
GAPDH Fwd	5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3'		7
GAPDH Rev	5'-GCTGGTGAAGACCTCT-3'	248 pb	8

[0053] Inmunotransferencias (IT): Mediante métodos estándar, se obtuvieron extractos de proteínas totales (extractos celulares totales), así como extractos de proteínas nucleares y extractos de proteínas citoplásmicas de células esplénicas o de células B aisladas. Las proteínas en los extractos obtenidos se separaron en cada caso mediante SDS-Page y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Anticuerpos usados: anti-GAPDH (monoclonal 6C5, Santa Cruz Biotechnology), anti-JAK1 (de conejo contra ratón), anti-fosfo-JAK1 (de conejo contra ratón, Cell Signaling Technology), anti-STAT-6 (monoclonal YE361), anti-fosfo-STAT-6 (monoclonal Y641, Abcam), anti-SMC3 (de conejo contra ratón), anti-SP1 (de conejo contra ratón, purificado por afinidad, Bethyl Laboratories), anti-SWAP-70 (de conejo contra ratón, purificado por afinidad).

[0054] Inmunofluorescencia (IF): La detección de las proteínas SWAP-70 y STAT-6 se llevó a cabo por inmunofluorescencia en linfocitos B purificados mediante MACS (1-2 x 10<sup>6</sup> células/ml) estimulados con IL-4 o con IL-4 y CD40L, con anti-STAT-6 (1:100, Abcam) o bien con anti-SWAP-70 (de conejo contra ratón, purificado por afinidad, 1 µg/ml) y un anticuerpo de cabra contra Cy3 de conejo (1:500, Dianova) como anticuerpo secundario.

[0055] Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP): Se estimularon linfocitos B purificados mediante MACS (2 x 10<sup>6</sup> células/ml, de ratones naturales o ratones *Swap-70*<sup>-/-</sup>) con IL-4 (2 ng/ml) durante 4 h y después de fijarlos (formaldehído al 1 %, 10 min, temperatura ambiente), se rompieron con ultrasonidos en tampón de ChIP (SDS al 1 %, EDTA 10 mM, TrisHCl 50 mM, pH 8,1, cóctel de inhibidores de proteasas). Después de la centrifugación, se obtuvo un sobrenadante con fragmentos de ADN con un tamaño de 100 a 500 pb. El sobrenadante se purificó con perlas de proteína A bloqueadas (perlas de agarosa con proteína A bloqueadas con 0,2 mg/ml de ADN de esperma de salmón y 0,5 mg/ml de BSA) y a continuación se incubó (4 °C durante la noche) con 1 µg de anti-SWAP-70, 2 µg de anti-STAT-6 (M20), 2 µg de anti-BCL-6 (N-3) o 1 µg de IgG de conejo (Santa Cruz Biotech.). Las muestras así obtenidas se incubaron con perlas de proteína A bloqueadas (4 °C, 1 h). Las perlas se lavaron y eluyeron (NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, SDS al 1 %), se incubaron durante 6 h a 65 °C y se trataron con proteinasa K (1 h, 45 °C). El ADN se aisló y se llevó a cabo una PCR con los pares de cebadores siguientes:

Promotor Iε (I epsilon):

Nombre	Secuencia	Longitud del producto	SEQ ID NO
I epsilon Fwd	5'-CTAGAAAGAGGCCTACACCTG-3'		9
I epsilon Rev	5'-CCAGACTGTTCTTATTCG-3'	243 pb	10

Promotor Iγ1 (I gamma1):

Nombre	Secuencia	Longitud del producto	SEQ ID NO
I gamma1 Fwd	5'-AGGGGGTGAGGGGGAGTCCA-3'		11
I gamma1 Rev	5'-CCCCCAAAGGCCAGGTGC-3'	145 pb	12

Promotor CD23:

Nombre	Secuencia	Longitud del producto	SEQ ID NO
CD23 Fwd	5'-TGGCATCGCTGACTCTCCAACA-3'	118 pb	13
CD23 Rev	5'-CTGGGTGGCCACAGCACACA-3'		14

5 Promotor control (sin la región de unión de STAT-6)

Nombre	Secuencia	Longitud del producto	SEQ ID NO
Pr Fwd	5'-TTTGAAGCTGGAGCTCAGCTGG-3'		15
Pr Rev	5'-TCCATGGTGCTAGCCATATGC-3'	160 pb	16
I gamma2a Fwd	5'-CTGTCACCCACTTTCAATCCTG-3'		17
I gamma2a Rev	5'GCGTGAAGAAGATTGCTGCTATT-3'	148 pb	18

RESULTADOS:

- 10 [0056] Los resultados de los experimentos presentados anteriormente se resumen de la manera siguiente:  
El fraccionamiento celular de las células esplénicas naturales o *Swap-70<sup>-/-</sup>* demuestra que STAT-6 se acumula en  
respuesta a la estimulación con IL-4 en extractos nucleares naturales, preparados por extracción salina de núcleos  
aislados. Sin embargo, los extractos nucleares de las células esplénicas *Swap-70<sup>-/-</sup>* contienen menos STAT-6 que  
15 las células esplénicas naturales (figuras 2A, 2B). De manera similar a STAT-6 (figura 3), SWAP-70 se acumula en el  
núcleo por la estimulación con IL-4 o IL-4 combinada con CD40L. La detección de STAT-6 en células B naturales y  
*Swap-70<sup>-/-</sup>* por IF después de la fijación y permeabilización de las mismas (*input*) no mostró ninguna diferencia  
aparente entre las células naturales y las células *Swap-70<sup>-/-</sup>* activadas por IL-4. Esto puede indicar que STAT-6 se  
transloca eficientemente a los núcleos de las células *Swap-70<sup>-/-</sup>* y de este modo puede fijarse y hacerse visible allí  
20 experimentalmente, pero no se une demasiado estrechamente a la cromatina y por ello se pierde en las  
preparaciones de los extractos nucleares. A partir de estos datos puede concluirse que, en ausencia de SWAP-70,  
STAT-6 presenta una baja afinidad por el promotor I $\epsilon$  y que la presencia de SWAP-70 aumenta esta afinidad. STAT-  
6 se une a distintos promotores con diferente afinidad y la unión a I $\epsilon$  requiere una alta afinidad.
- [0057] Para medir la intensidad de la asociación de STAT-6 con la cromatina en presencia o ausencia de SWAP-70,  
los inventores rompieron las células en un homogeneizador Dounce, para evitar una salida del núcleo inducida por  
25 detergentes de la STAT-6 unida laxamente. Se usaron concentraciones de sal crecientes para extraer  
secuencialmente las proteínas de los núcleos de esplenocitos activados por IL-4 (figura 2C). Unas fracciones de  
STAT-6 comparables se disociaron de la cromatina a concentraciones de 0 mM y 50 mM de sulfato de amonio en los  
extractos nucleares de núcleos naturales y *Swap-70<sup>-/-</sup>*. Estas fracciones proceden de la STAT-6 nucleoplásmica, que  
no está unida a la cromatina o lo está con baja afinidad. Sin embargo, la cantidad de STAT-6 extraída de los núcleos  
30 de las células *Swap-70<sup>-/-</sup>* mediante la adición de sulfato de amonio 200 mM fue considerablemente inferior a la  
extraída de los núcleos naturales. Esto indica, en general, una unión más débil de STAT-6 a la cromatina en  
ausencia de SWAP-70. Dado que la unión a I $\epsilon$  requiere una alta afinidad, parece que STAT-6 se encuentra  
notablemente reducida en este promotor o incluso está ausente.
- [0058] Para demostrar lo anterior, los inventores llevaron a cabo inmunoprecipitaciones de cromatina (ChIP) en  
35 células B naturales o *Swap-70<sup>-/-</sup>* estimuladas con IL-4, usando anticuerpos contra SWAP-70 o STAT-6. Células B  
naturales (wt) sin estimular sirvieron como controles negativos. Se usaron cebadores específicos de la región I $\epsilon$  con  
la región de unión de STAT-6 para el análisis mediante PCR semicuantitativa del ADN precipitado con SWAP-70 o  
STAT-6. Los resultados demuestran que en las células naturales STAT-6 solo se une a la región promotora  
específica I $\epsilon$  (I epsilon) después del tratamiento con IL-4 (figuras 4A, 4B). En las células B *Swap-70<sup>-/-</sup>* (ko)  
40 estimuladas con IL-4, la unión de STAT-6 con I $\epsilon$  se encuentra fuertemente reducida (figuras 4A, 4B). No pudo  
detectarse una unión de STAT-6 con I $\gamma$ 1 (I gamma1), lo que indica una interacción débil y/o solo transitoria de STAT-  
6 con el promotor  $\gamma$ 1. Los controles, las regiones promotoras de IgG2a (I gamma2 - I $\gamma$ 2a) y de un gen de proteasoma  
(Pr), que carecen de regiones de unión para STAT-6, no generaron ninguna señal de PCR (figuras 4A, 4B). Se sabe  
que CD23 y IL4R se transcriben bajo el control de STAT-6. Las células B *Swap-70<sup>-/-</sup>* muestran una inducción normal  
45 de la expresión de CD23 en respuesta a la estimulación de IL-4 o CD40 por CD40L o tras el tratamiento con los dos  
estimuladores, así como una regulación por exceso de IL-4R $\alpha$  comparable con las células naturales. Esto demuestra  
un control por STAT-6 de los promotores de CD23 y IL4R independiente de SWAP-70. De este modo, SWAP-70  
regula principalmente la transcripción dependiente de STAT-6 a partir del promotor I $\epsilon$ . La unión de STAT-6 al  
promotor de CD23 se ensayó como control. En ensayos de ChIP con células B naturales y *Swap-70<sup>-/-</sup>* se observó  
50 una incorporación comparable de STAT-6 al promotor de CD23 (figuras 4A, 4B).
- [0059] El ensayo de ChIP con anticuerpos anti-Swap-70 (a-S-70) demuestra que SWAP-70 se incorpora al promotor  
I $\epsilon$  en las células naturales de manera dependiente de IL-4 (figuras 4A, 4B). Por consiguiente, SWAP-70 se une  
directa o indirectamente al promotor I $\epsilon$ .

[0060] Se sabe que BCL-6 antagoniza la unión de STAT-6 al promotor I $\epsilon$ . BCL-6 y STAT-6 se unen a secuencias solapantes dentro del promotor I $\epsilon$ . Por lo tanto, BCL-6 compete con STAT-6 e inhibe la transcripción a través de la incorporación de correpresores. Los inventores determinaron si la ausencia de STAT-6 se correlaciona con una mayor presencia de BCL-6 en el promotor I $\epsilon$ . Mientras que en las células naturales (wt) los datos de CHIP muestran una reducción de la unión de BCL-6 después de la estimulación con IL-4, en las células B *Swap-70<sup>-/-</sup>* activadas por IL-4 se observa una unión de BCL-6 al promotor I $\epsilon$  notablemente mayor en comparación con las células naturales. Dado que la expresión de ARN y proteína de BCL-6 en las células B *Swap-70<sup>-/-</sup>* equivale a la de las células B naturales (figura 5), esto demuestra el control de la unión de BCL-6 al promotor I $\epsilon$  por SWAP-70.

[0061] BCL-6 no regula la transcripción de CD23. En consecuencia, no se obtuvieron señales de CHIP específicas de CD23 con los distintos anticuerpos anti-BCL-6.

[0062] En conjunto, de este modo los inventores han demostrado que SWAP-70 se necesita para la transcripción germinal (GLT) de  $\epsilon$  inducida por IL-4, en lo que SWAP-70 controla el equilibrio crítico entre BCL-6 y STAT-6 en el promotor I $\epsilon$ . Puede concluirse que la interacción de SWAP-70 con BCL-6 y/o el promotor I $\epsilon$  impide que BCL-6 bloquee la inducción de la GLT de  $\epsilon$  mediada por STAT-6. El conocimiento de que, por tanto, SWAP-70 es un regulador de mayor relevancia de BCL-6 y STAT-6 en la regulación específica de la producción de IgE permite actuar de manera dirigida sobre esta ruta metabólica e inhibir así específicamente la producción de IgE, que es una molécula clave en las alergias y muchas enfermedades autoinmunitarias.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

[0063]

<110> Universidad Técnica de Dresde

<120> Procedimiento y medios para la identificación de sustancias que inhiben la producción de IgE

<130> 00017P0150DEWO

<150> DE 102010027827

<151> 15-04-2010

<160> 18

<170> PatentIn, versión 3.3

<210> 1

<211> 88

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 1

**cccactgtgc cttagtcaac ttccaagaa cagaatcaaa agggaacttc caaggctgct 60**

**aaggccgggg gttcccaccc cactttta 88**

<210> 2

<211> 17

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 2

tgctcctag aaagagg 17

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 3

tcgagaagcc tgaggaatgt 20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 4

atagacagat ggggtgtcg 20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 5

ctggccagcc actcacttat 20  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 6  
 cagtccttt acagggcttc 20  
 10 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador  
 <400> 7  
 cacaggacta gaacacctgc 20  
 <210> 8  
 <211> 16  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 8  
 25 gctggtgaag acctct 16  
 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 9  
 ctagaaagag gcctacacct g 21  
 <210> 10  
 35 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 10  
 ccagactgtt cttattcg 18  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 11  
 agggggtgag ggggagtcca 20  
 50 <210> 12  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 55 <223> Cebador  
 <400> 12  
 ccccaaagg cccaggtgc 19  
 <210> 13  
 <211> 22  
 60 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 13  
 65 tggcatcgct gactctcaa ca 22

ES 2 597 003 T3

<210> 14  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
5 <220>  
<223> Cebador  
<400> 14  
ctgggtggcc acagcacaca 20  
10 <210> 15  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador  
15 <400> 15  
tttgaactgg agctcagctg g 21  
<210> 16  
<211> 21  
<212> ADN  
20 <213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador  
<400> 16  
tccatggtgc tagccatag c 21  
25 <210> 17  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
30 <223> Cebador  
<400> 17  
ctgtcaccca cttcaatcc tg 22  
<210> 18  
<211> 23  
35 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador  
<400> 18  
40 gcgtgaagaa gattgctgct att 23

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la identificación de una sustancia que inhibe la producción de IgE, en que el procedimiento comprende lo siguiente:
- 5 (i) la puesta en contacto de:
- (a) al menos una sustancia de prueba con
  - (b) SWAP-70 y
  - (c) BCL-6 y/o STAT-6
- 10 (ii) la determinación de la interacción de los componentes de unión *in vitro*, *in situ* o *in vivo*, en lo que en la medición de la interacción en vertebrados se excluyen los humanos,
- (iii) la selección de una sustancia de prueba que inhibe específicamente la activación de STAT-6 mediada por SWAP-70 y/o refuerza la inhibición mediada por BCL-6 de la activación de STAT-6 mediada por SWAP-70.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se selecciona una sustancia de prueba que inhibe la interacción de SWAP-70 con STAT-6.
3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque se selecciona una sustancia de prueba que afecta de tal manera a la interacción de SWAP-70 con BCL-6, que se refuerza el efecto de BCL-6.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de elementos reguladores del gen IgE a los que se unen tanto STAT-6 como BCL-6.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque se selecciona una sustancia de prueba que desplaza la interacción de los dos antagonistas STAT-6 y BCL-6 con los elementos reguladores del gen IgE a favor de BCL-6.
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la interacción de las proteínas y, en su caso, de los elementos reguladores del gen IgE se mide *in vitro* o *in situ*.
- 30 7. Kit de prueba para la identificación de una sustancia que inhibe la producción de IgE que contiene:
- (a) SWAP-70 y
  - (b) BCL-6 y/o STAT-6
  - (c) en su caso, elementos reguladores del gen IgE,
- 35 en el que:
- i) los componentes (a) y (b) se encuentran respectivamente como proteínas aisladas y el componente (c) como ADN aislado o
  - ii) todos los componentes se encuentran en una célula o en un organismo pluricelular no humano y los componentes (a) y (b) incluyen un marcador.
- 40

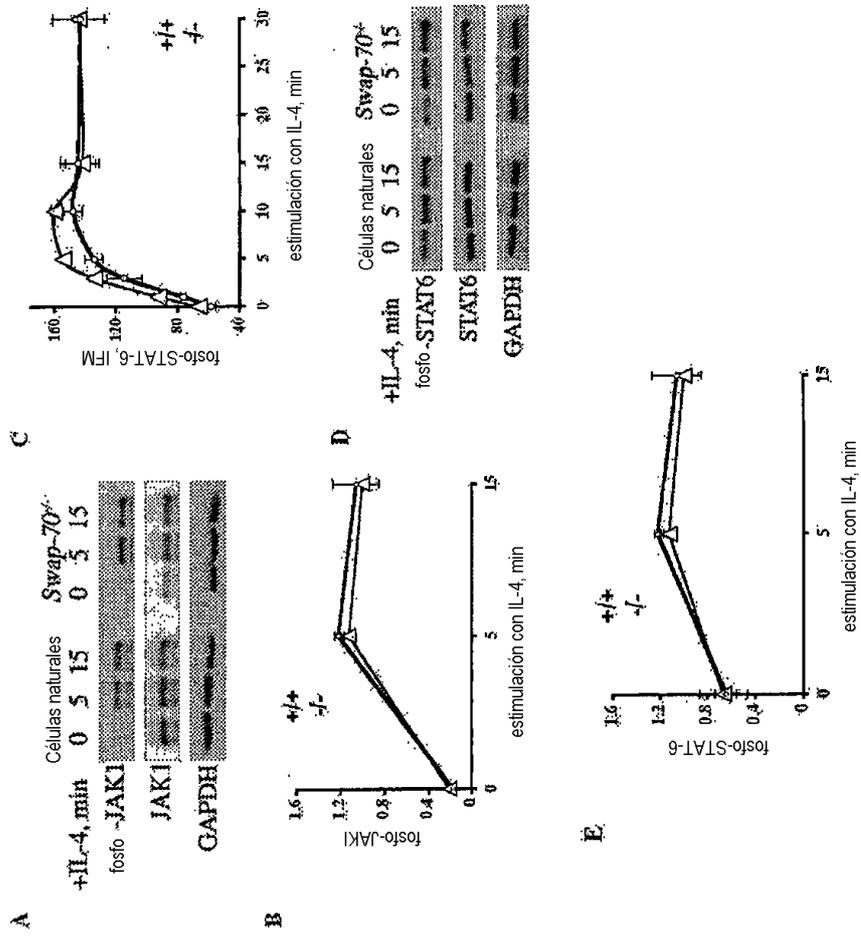


Fig. 1

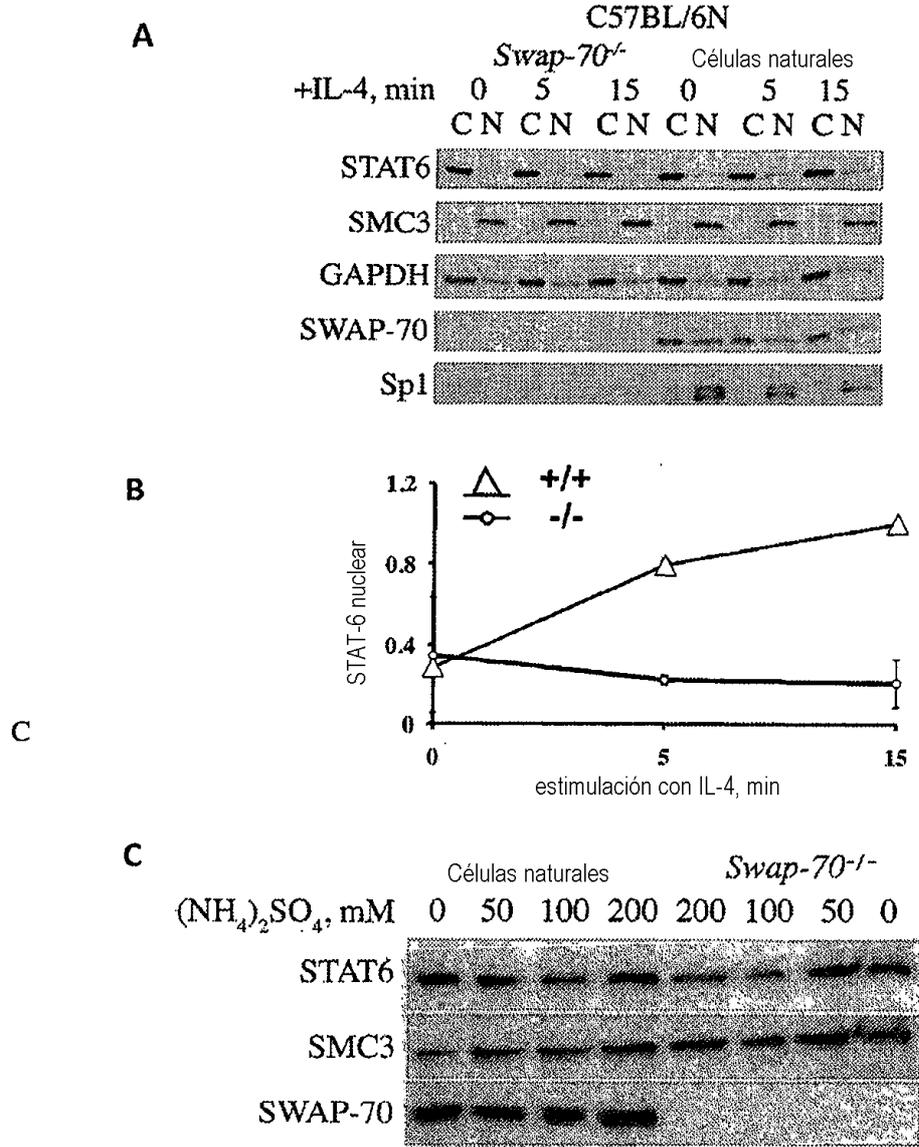


Fig. 2

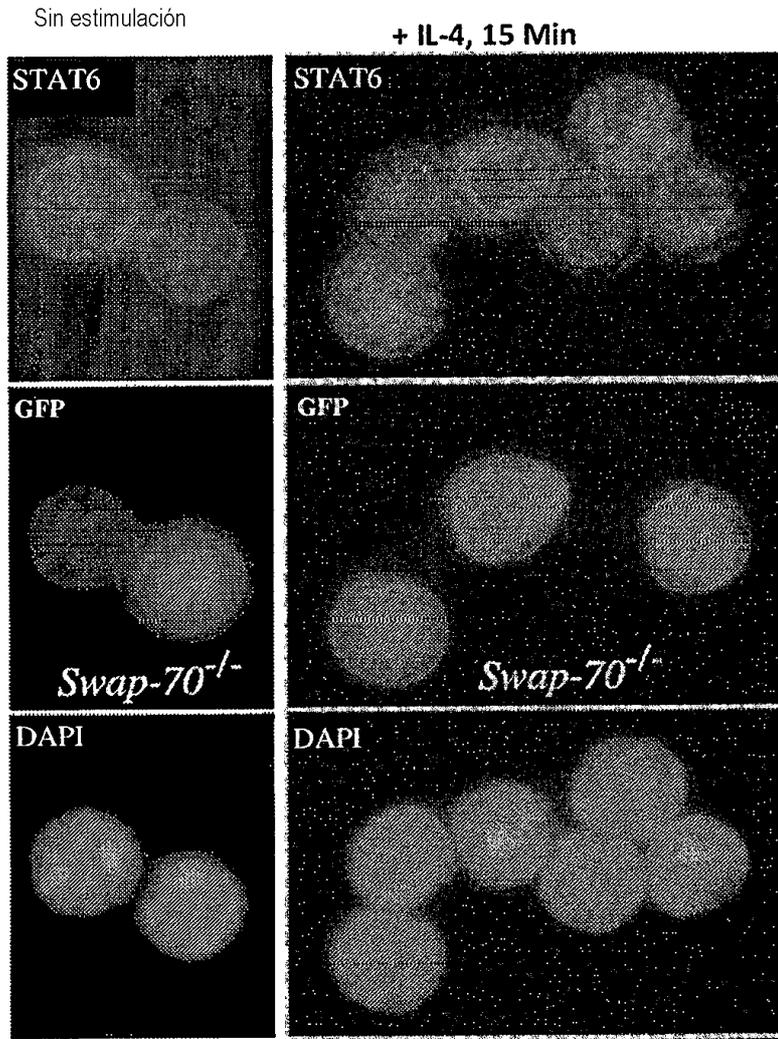


Fig. 3

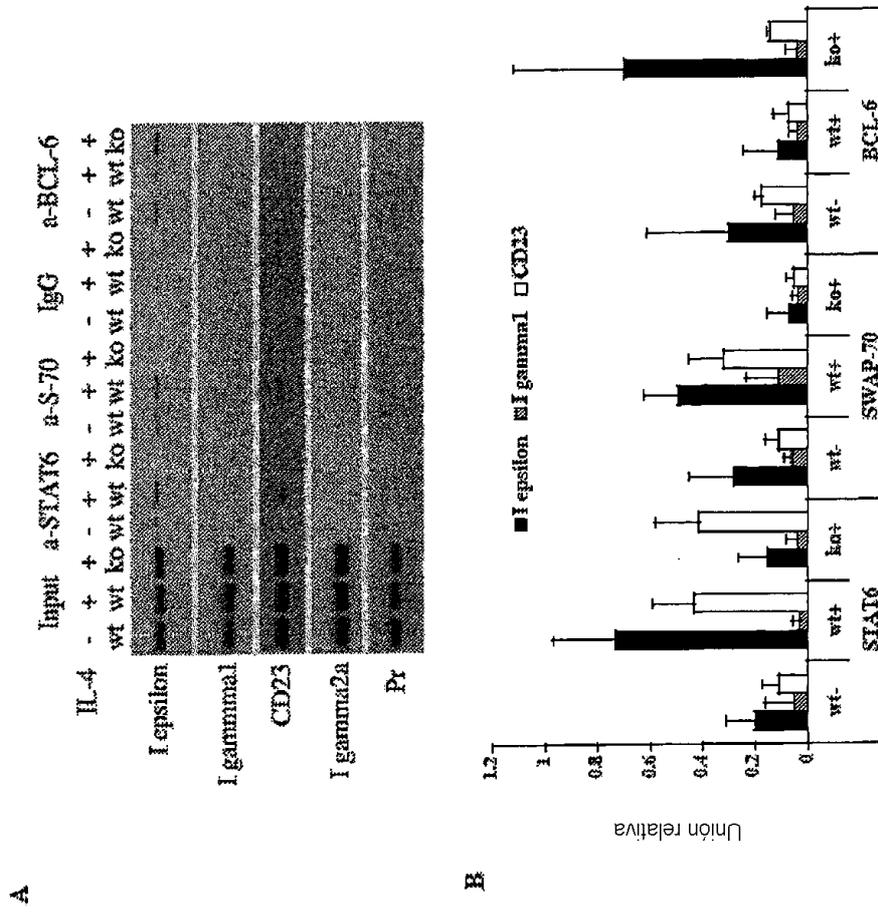


Fig. 4

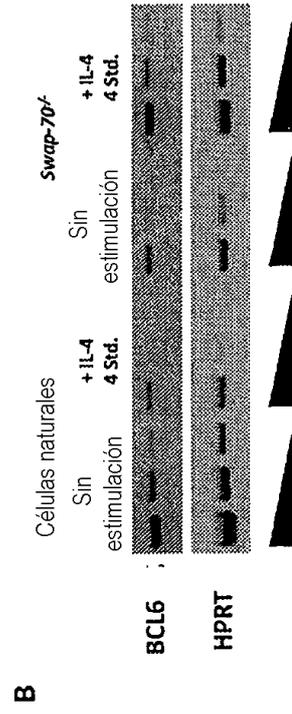
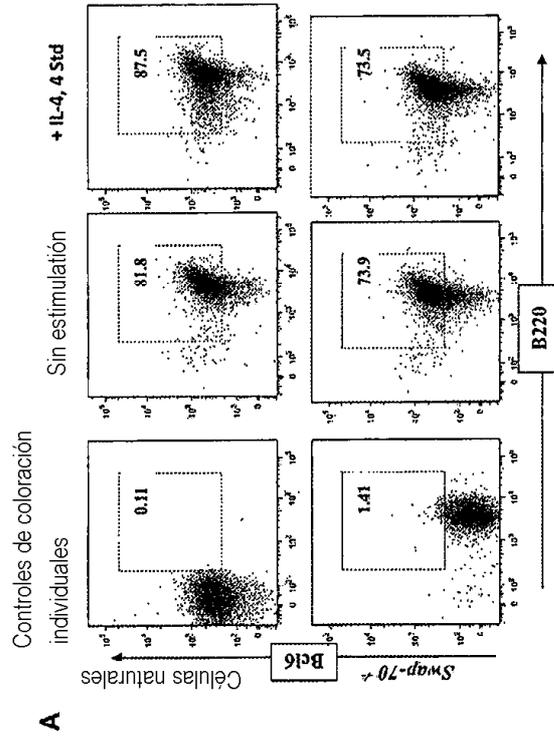


Fig. 5

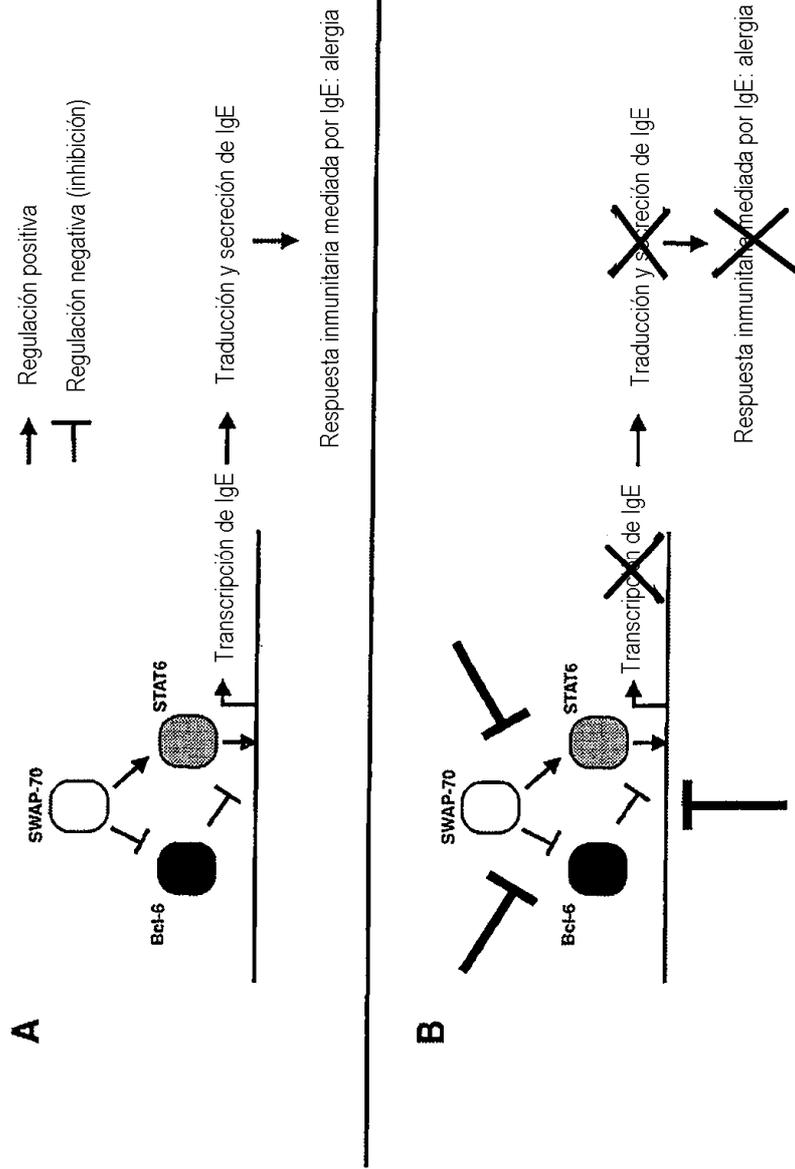


Fig. 6

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- US 6528284 B1 [0004]
- US 2003143611 A1 [0004]
- US 20030166018 A1 [0005]
- DE 102010027827 [0063]

10