

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 922**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2010 PCT/US2010/026838**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10104959**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2010 E 10751361 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2405928**

54 Título: **Métodos de tratamiento y diagnóstico para trastornos de hipersensibilidad**

30 Prioridad:

11.03.2009 US 209795 P

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

19.05.2017

73 Titular/es:

**PROMEDIOR INC. (100.0%)
101 Hartwell Avenue
Lexington, MA 02421-3125, US**

72 Inventor/es:

MURRAY, LYNNE, ANNE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 612 922 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

Métodos de tratamiento y diagnóstico para trastornos de hipersensibilidad

Antecedentes de la invención

5 Las células T CD4 nativas pueden diferenciarse tras la activación o en células o bien Th1 o bien Th2, que tienen funciones inmunitarias significativamente diferentes basándose en las citocinas que producen. Las células Th1 promueven inmunidad de tipo 1, produciendo IFN- γ que impulsa inmunidad mediada por células y síntesis de IgG2A. Las células Th2 potencian la inmunidad de tipo 2 produciendo IL-4, IL-5 e IL-13 y promoviendo respuestas mediadas por anticuerpos y cambio de clase a IgG1 e IgE. Estas respuestas inmunitarias pueden ser perjudiciales cuando no se regulan de manera apropiada, como en enfermedades autoinmunitarias, o cuando son excesivas, como en enfermedades alérgicas.

10 La ruta de diferenciación de Th1 normalmente se estimula en respuesta a microbios infecciosos que activan macrófagos y/o células NK. Estos incluyen bacterias, algunos parásitos, virus y determinados antígenos extraños. Una característica común de estos antígenos es que provocan reacciones inmunitarias con la producción de IL-12. IL-12 se une a receptores en células CD4+ estimuladas con antígeno y activa el factor de transcripción STAT-4. Posteriormente, STAT-4 promueve la diferenciación de las células T en células Th1. Un factor de transcripción denominado T-bet también desempeña un papel crítico en el desarrollo de Th1. T-bet se induce por IFN- α y proporciona una amplificación de las respuestas de Th1. Las células Th1 secretan IFN- γ , linfotóxina (LT) y TNF. IFN- γ actúa sobre los macrófagos para aumentar la fagocitosis y promueve la eliminación de microorganismos en fagolisomas y en linfocitos B para estimular la producción de anticuerpos IgG que opsonizan microbios y otros antígenos para fagocitosis. LT y TNF activan neutrófilos y estimulan la inflamación. La IL-2 es un factor de crecimiento autocrino compuesto por células Th1.

15 La diferenciación en Th2 se produce normalmente en respuesta a helmintos y alérgenos. La respuesta del huésped a estos antígenos puede producir estimulación crónica de células T, a menudo sin una respuesta inmunitaria innata significativa o activación de macrófagos. La diferenciación de células T estimuladas por antígenos en el subconjunto Th2 depende de IL-4, que funciona activando STAT-6. STAT-6, de manera similar a STAT-4, es un factor de transcripción que estimula el desarrollo de Th2. Otro factor de transcripción denominado GATA-3 también desempeña un papel importante en el desarrollo de Th2 activando la transcripción de genes de citocina específicos de Th2. Las células Th2 secretan IL-4 e IL-5. IL-4 actúa sobre las células B para estimular la producción de anticuerpos que se unen a mastocitos, tales como IgE. IL-4 también es una citocina autocrina de crecimiento y diferenciación para células Th2. IL-5 activa eosinófilos, principalmente una defensa contra infecciones parásitas. Las citocinas de Th2 también inhiben tanto la activación de macrófagos clásica como las reacciones mediadas por Th1.

20 La alergia se clasifica como una reacción de hipersensibilidad de tipo I, también conocida como reacción de hipersensibilidad de tipo inmediato, y está estimulada por la producción mediada por Th2 de IgE. Las células Th2 pueden promover el cambio de isotipo de anticuerpos de células B de IgM a IgE. IgE puede producirse por células plasmáticas ubicadas en los ganglios linfáticos que drenan desde el sitio de entrada del antígeno o que se producen periféricamente en el sitio local de la reacción alérgica. IgE sensibiliza mastocitos y basófilos uniéndose al receptor de alta afinidad para IgE (Fc ϵ RI) expresado sobre su superficie. Tras la reticulación mediada por alérgenos del complejo IgE-Fc ϵ RI, los mastocitos y los basófilos se desgranulan para liberar aminas vasoactivas (principalmente histamina), mediadores lipídicos (prostaglandinas y cisteinil-leucotrienos), citocinas y quimiocinas, que caracterizan todos ellos la fase inmediata de la reacción alérgica. La histamina es uno de los factores clave de la fase inmediata de la reacción alérgica, regulando células dendríticas, células T y cambio de clase de isotipos de anticuerpos a través de cuatro receptores de histamina (HR) distintos. HR2 actúa como un receptor anti-inflamatorio y anti-alérgico, mientras que HR1, HR3 y HR4 muestran efectos proinflamatorios. Los mastocitos no están asociados únicamente con reacciones de hipersensibilidad de tipo I, sino que también desempeñan un papel en la inflamación crónica. IgE también se une a Fc ϵ R1 sobre la superficie de las células dendríticas y los monocitos y se une a Fc ϵ R2 sobre la superficie de células B. Estas interacciones potencian la captación de alérgenos por estas células presentadoras de antígeno y la posterior presentación de péptidos derivados de alérgenos a células T CD4+ específicas, que impulsan la fase tardía de la reacción alérgica. El tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-IgE reduce significativamente las respuestas de fase tardía inducidas por alérgeno, lo que demuestra el papel de IgE en la potenciación de las respuestas de células T a alérgenos.

25 Tras la exposición a alérgenos, pueden detectarse niveles aumentados de histamina y triptasa en el lavado broncoalveolar en el asma alérgica, en lavados nasales en rinitis, en lágrimas en conjuntivitis y en el sistema circulatorio en anafilaxia sistémica. En las vías respiratorias bajas, las dianas principales para los mediadores de mastocitos son las glándulas secretoras, los vasos sanguíneos y el músculo liso bronquial. La broncoconstricción es la principal manifestación clínica de las respuestas de fase temprana en el asma alérgica, manifestada por una disminución en el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁) en el plazo de 1 hora de exposición a alérgeno. En la mucosa nasal, las dianas potenciales para los mediadores de mastocitos son las glándulas mucosas, los nervios, los vasos sanguíneos y los senos venosos. La manifestación clínica de las respuestas de fase temprana en las vías respiratorias superiores son picor, estornudos, obstrucción nasal y exudado seroso. Normalmente, las respuestas de fase temprana se resuelven en el plazo de una hora.

La respuesta de fase tardía se desarrolla como resultado de citocinas y quimiocinas generadas por células inflamatorias residentes, tales como mastocitos, macrófagos y eosinófilos. Aunque los mastocitos no son esenciales para la respuesta de fase tardía, la detección de IL-5, IL-6, IL-13 y TNF- α en mastocitos, y su liberación tras la reticulación de IgE, apoya los papeles tanto para IgE como para mastocitos en garantizar la hiperreactividad e inflamación alérgica persistentes. En inflamaciones alérgicas crónicas de pulmón y piel, el tejido subepitelial se convierte en un tejido de tipo órgano linfoide secundario con la infiltración de células T, células dendríticas y células B. Las células T activadas interactúan con células tisulares residentes, así como con otras células inflamatorias migratorias. Activan células epiteliales bronquiales, células del músculo liso, macrófagos, fibroblastos en los pulmones asmáticos crónicos y queratinocitos epidérmicos en la piel alérgica. Las células tisulares residentes contribuyen a la inflamación mediante la secreción de quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias. La producción de IFN- γ y TNF- α junto con la expresión del ligando FAS por células Th1 conduce a la activación de células epiteliales seguido por apoptosis, y pone en peligro la función de barrera de las células epiteliales en los pulmones y la piel. Esto implica dos fases. En primer lugar, la fase proinflamatoria con activación de células epiteliales y la liberación de quimiocinas y citocinas proinflamatorias. Esto va seguido por la muerte eventual de queratinocitos y células epiteliales bronquiales, lo que conduce a una patología visible que incluye descamación epitelial en asma crónica y espongiosis epidérmica en eccema.

La destrucción mediada por anticuerpos de células huésped es un efecto secundario poco común asociado con la ingesta de determinados fármacos, tales como el antibiótico penicilina. Se trata de reacciones de hipersensibilidad de tipo II en las que el fármaco se une a la superficie celular y sirve como diana para anticuerpos IgG anti-fármaco y posteriormente promueven la destrucción de la célula. Los anticuerpos anti-fármaco sólo se producen en una minoría de la población, y no se entiende bien por qué se generan estos anticuerpos en estos individuos. El anticuerpo unido a la célula desencadena la eliminación de la célula de la circulación, predominantemente por macrófagos tisulares en el bazo, que portan receptores Fc γ .

Pueden surgir reacciones de hipersensibilidad de tipo III con antígenos solubles. La patología está provocada por la deposición de agregados de antígeno-anticuerpo o complejos inmunitarios dentro de sitios de tejidos y órganos particulares. Se generan complejos inmunitarios en todas las respuestas de anticuerpos, pero su potencial patogénico se determina, en parte, por su tamaño, y por la cantidad, afinidad e isotipo del anticuerpo que responde. Los agregados más grandes se fijan al complemento y se eliminan fácilmente de la circulación por el sistema fagocítico mononuclear. Sin embargo, los complejos pequeños que se forman tienden a depositarse en las paredes de los vasos sanguíneos. Pueden unirse a receptores Fc en leucocitos, lo que conduce a activación de leucocitos y a lesión tisular.

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV habitualmente se estimulan por antígenos solubles y dan como resultado trastornos inflamatorios crónicos, como asma crónica y rinitis alérgica crónica. Una característica importante del asma es la inflamación crónica de las vías respiratorias, que se caracteriza por la presencia continuada de números aumentados de linfocitos Th2, eosinófilos, neutrófilos y otros leucocitos. Estas células estimulan la secreción aumentada de moco. La acción directa de citocinas de Th2 tales como IL-9 e IL-13 sobre las células epiteliales de las vías respiratorias puede desempeñar un papel sobre la inducción de metaplasia de células caliciformes y la secreción de moco.

Los trastornos de hipersensibilidad más inmediatos están asociados con respuestas de Th2 excesivas a antígenos del entorno normalmente inocuos. Estos trastornos predominan en la mayoría de los países industrializados y constituyen una preocupación sanitaria creciente en las naciones en vías de desarrollo. Existen numerosos medicamentos para tratar o aliviar los síntomas asociados con las enfermedades de hipersensibilidad, incluyendo terapias sistémicas así como tratamientos más localizados. Lo más frecuentemente se recetan agentes terapéuticos locales para lograr el efecto máximo en el sitio de enfermedad a la vez que se minimiza la posibilidad de efectos secundarios sistémicos. Estos tratamientos locales generalmente se administran por vía tópica o mediante aerosol/pulverizador, incluyendo descongestivos alfa-adrenérgicos, broncodilatadores adrenérgicos, antihistamínicos, y corticosteroides. Desgraciadamente, muchos de estos fármacos todavía tienen la desventaja de producir efectos secundarios no deseados incluso cuando se administran localmente. Puesto que muchos pacientes usan cantidades excesivas de estos fármacos para aliviar los síntomas rápidamente, hay un riesgo aumentado de que el paciente padezca efectos perjudiciales. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de desarrollar tratamientos más eficaces para las causas subyacentes de respuestas de hipersensibilidad.

Sumario de la invención

La invención se caracteriza por las realizaciones tal como se define en las reivindicaciones, específicamente para un polipéptido de amiloide P sérico (SAP) para su uso en el tratamiento, la prevención o la reducción de la gravedad de una enfermedad alérgica de las vías respiratorias en un paciente. En parte, la divulgación demuestra que el SAP y los agonistas de SAP son útiles en el tratamiento de trastornos de hipersensibilidad. Un aspecto de la memoria descriptiva proporciona métodos para tratar, inhibir o reducir la gravedad de un trastorno de hipersensibilidad en un paciente que necesita los mismos mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de SAP. La administración de un agonista de SAP puede retrasar el desarrollo de un trastorno de hipersensibilidad, reducir el número de días en que un paciente está aquejado de un trastorno de hipersensibilidad, y/o reducir la gravedad de un trastorno de hipersensibilidad. La divulgación proporciona métodos para tratar

pacientes aquejados de un trastorno de hipersensibilidad, así como pacientes en riesgo de desarrollar un trastorno de hipersensibilidad. La administración de un agonista de SAP puede comenzar antes de, simultáneamente con o tras tratamientos que pueden colocar a los pacientes en riesgo de desarrollar un trastorno de hipersensibilidad. El SAP y los agonistas de SAP pueden ser útiles en el tratamiento de un trastorno de hipersensibilidad antes de la aparición de fibrosis.

La divulgación proporciona además métodos para tratar, inhibir o reducir la gravedad de un trastorno de hipersensibilidad en el sistema respiratorio de un paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de SAP. La administración de un agonista de SAP puede retrasar el desarrollo de un trastorno de hipersensibilidad respiratorio, reducir el número de días en que un paciente está aquejado de un trastorno de hipersensibilidad respiratorio, y/o reducir la gravedad de un trastorno de hipersensibilidad respiratorio. El SAP y los agonistas de SAP pueden usarse para tratar respuestas de asma alérgica. El SAP y los agonistas de SAP pueden usarse para tratar respuestas agudas de asma alérgica antes de la aparición de enfermedad de asma crónica. En determinados casos, el trastorno de hipersensibilidad tratado no es asma. En determinados casos, el trastorno de hipersensibilidad tratado no es asma crónica.

La divulgación proporciona además métodos para tratar, inhibir o reducir la gravedad de un trastorno de hipersensibilidad en un paciente mediante la administración de una composición que incluye un agonista de SAP y un agente activo adicional. El agente activo adicional puede seleccionarse del grupo de anticuerpos anti-IgE, agonista de Th1, antagonistas de Th2, agonistas beta a corto y largo plazo, corticosteroides, cromolina, xantinas e inmunoterapia específica de alérgeno. El agente activo puede ser un inhibidor de mastocitos, histamina, prostaglandinas, quimiocinas, mediadores asociados con Th1 y Th2, y cisteinil-leucotrienos. La administración de la composición a un paciente puede retrasar el desarrollo de un trastorno de hipersensibilidad, reducir el número de días en que un paciente está aquejado de un trastorno de hipersensibilidad, y/o reducir la gravedad de un trastorno de hipersensibilidad.

La divulgación proporciona adicionalmente un kit para el tratamiento de un trastorno de hipersensibilidad en un paciente. El kit comprende uno o más agonistas de SAP que pueden formularse para administrarse conjuntamente. El agonista de SAP puede formularse para administrarse conjuntamente con un agente activo adicional.

Los trastornos de hipersensibilidad que pueden tratarse como parte de la invención incluyen rinitis alérgica, sinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, asma alérgica, eccema atópico, dermatitis, urticaria, anafilaxia, alergias a alimentos, reacciones alérgicas a veneno de insectos que pican, broncoconstricción alérgica, disnea alérgica, aumento alérgico de producción de moco en los pulmones, neumonitis, psoriasis, y/o otros trastornos de hiperreactividad mediados por Th2. En determinados aspectos, las composiciones anti-hipersensibilidad de la divulgación pueden usarse para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad ocular inflamatoria incluyendo, por ejemplo, enfermedades de xerofthalmia, conjuntivitis alérgica, uveítis y uveoretinitis así como inflamación ocular asociada con trasplante de córnea, trastornos neoplásico y trastornos congénitos.

La divulgación proporciona agonistas de SAP útiles en los métodos descritos en el presente documento. Los agonistas de SAP pueden administrarse por vía tópica, mediante inyección, mediante inyección intravenosa, mediante inhalación, liberación continua mediante depósito o bomba, y en cualquier combinación. Los agonistas de SAP pueden aumentar o imitar la señalización de SAP, aumentar la actividad de SAP, aumentar la expresión de SAP o aumentar los niveles de SAP en suero. Un agonista de SAP puede ser una molécula pequeña, ácido nucleico o polipéptido. El agonista de SAP puede ser un polipéptido de SAP, un anticuerpo anti-Fc γ RI, un anticuerpo anti-Fc γ RII, un anticuerpo anti-Fc γ RIII, un anticuerpo anti-Fc γ R reticulado, un anticuerpo IgG agregado o un anticuerpo IgG reticulado. El agonista de SAP puede formularse para administrarse conjuntamente con uno o más agonistas de SAP u otros agentes activos.

La divulgación comprende además métodos para tratar o prevenir un trastorno o estado de hipersensibilidad en un paciente usando células T reguladoras. El método comprende obtener una muestra que contiene células T, poner en contacto la muestra de células T con un agonista de SAP en un cultivo *ex vivo* para producir una población celular enriquecida en células T reguladoras, aislar las células T reguladoras y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las células T reguladoras aisladas al paciente para tratar o prevenir un trastorno o estado de hipersensibilidad. En algunas realizaciones, las células T reguladoras son células T reguladoras que producen FoxP3⁺ y/o IL-10. El agonista de SAP puede promover la supresión mediada por células T reguladoras del trastorno o estado de hipersensibilidad. La administración de células T reguladoras puede inhibir la aparición de un trastorno o estado de hipersensibilidad, reducir el número de días en que un paciente está aquejado de un trastorno o estado de hipersensibilidad, y/o reducir la gravedad de un trastorno o estado de hipersensibilidad. La divulgación proporciona métodos para tratar tanto pacientes aquejados con un trastorno de hipersensibilidad, así como pacientes en riesgo de desarrollar un trastorno de hipersensibilidad. La administración de células T reguladoras puede comenzar antes de, simultáneamente con o tras tratamientos que pueden colocar a los pacientes en riesgo de desarrollar un trastorno de hipersensibilidad. Las células T reguladoras se administran periódicamente. En determinados aspectos, las células T reguladoras son útiles en el tratamiento de un trastorno de hipersensibilidad antes de la aparición de fibrosis. Se administra al paciente al menos un agente activo adicional. En determinados aspectos, el agente activo adicional es un agente terapéutico usado para tratar o prevenir el trastorno de hipersensibilidad. En determinados aspectos, el agente activo adicional es un agonista de SAP. En determinados aspectos, el agente activo adicional es

una citocina. Las citocinas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β , IL-15 y/o IL-17. El agente activo adicional puede administrarse periódicamente.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Figura 1. Alineación de secuencia de aminoácidos de polipéptidos de amiloide P sérico (secuencial señal no representada) humanos (SEQ ID NO: 1, aminoácidos 20-223 del n.º de registro de Genbank NP_001630), de *Gallus gallus* (SEQ ID NO: 2, aminoácidos 20-227 del n.º de registro de Genbank NP_001034653), de *Bos taurus* (SEQ ID NO: 3, aminoácidos 20-224 del n.º de registro de Genbank AAI02624) y de *Cricetulus migratorius* (SEQ ID NO: 4, aminoácidos 20-223 del n.º de registro de Genbank AAB28726). Los aminoácidos idénticos al SAP humano están sombreados.
- 10 Figura 2. La terapia con SAP exógeno previno y revirtió la hiperreactividad establecida de las vías respiratorias en un modelo de asma fúngica. Ratones C57BL/6 sensibilizados con *A. fumigatus* y expuestos a conidios recibieron PBS, o hSAP a través de inyección intraperitoneal cada dos días desde los días 0-15 (A) o 15-30 (B) tras los conidios, y se midió la resistencia de las vías respiratorias tras la exposición a metacolina usando un análisis invasivo de resistencia de las vías respiratorias (Buxco). Los datos son la media \pm EEM, n=5 ratones/grupo. *P<0,05, ***P<0,001 en comparación con la resistencia de las vías respiratorias a nivel inicial en el grupo de tratamiento apropiado.
- 15 Figura 3. Generación de citocina en cultivo de esplenocitos a partir de células aisladas y estimuladas con antígeno de *Aspergillus* y tratadas *in vitro* e *in vivo* con hSAP. Se aislaron células de bazo de animales 15 días (A) o 30 días (B) tras la exposición intratraqueal a conidios. Se trataron los animales *in vivo* con hSAP (8 mg/kg, q2d, intranasal; barras rellenas) o control con PBS (q2d, intranasal; barras en blanco) para las últimas dos semanas del modelo.
- 20 Figura 4. Expresión de FoxP3 en ganglios linfáticos de drenaje pulmonar (A y B) o cultivos de esplenocitos (C). A y B son de ganglios linfáticos de drenaje del pulmón tomados el día 15 de animales tratados con PBS (control), o animales tratados con SAP (+SAP) y teñidos para determinar FoxP3. C es de cultivos de esplenocitos que se estimularon con antígeno de *Aspergillus in vitro* en presencia o ausencia de SAP *in vitro* (0,1-10 μ g/ml) durante 24 horas. Para FoxP3 total, la expresión se cuantificó usando RT-PCR en tiempo real.
- 25 Figura 5. Efectos de SAP *in vivo* e *in vitro* sobre IL-10 y recuerdo de antígeno. Se sensibilizaron ratones y se expusieron a *Aspergillus fumigatus in vivo* y se trataron con control (PBS, i.p., 2qd, barras blancas) o SAP (5 mg/kg, i.p. q2d, barras rellenas) en los días 15-30 tras la exposición a conidios vivos. En el día 30, se sacrificó a los ratones. A. Se midió la IL-10 en pulmón total mediante luminex, B-E. Se estimularon cultivos de esplenocitos *in vitro* con antígeno de *Aspergillus fumigatus*, en presencia o ausencia de SAP y se evaluaron los sobrenadantes libres de células para determinar los niveles de proteínas B. IL-10, C. IL-4, D. IL-5 y E. IFN- γ mediante ELISA específica. Los animales tratados con SAP (i.p., 2qd en los días 15-30) tuvieron niveles potenciados de IL10 en los pulmones en comparación con los animales tratados con PBS (i.p., q2d, en los días 15-30) y en comparación con pulmones nativos, no alérgicos. Además, hubo una respuesta de recuerdo de antígeno disminuida, lo que indica número y/o función potenciada de células T reguladoras.

35 Descripción detallada de la invención

Visión general

Las normas asistenciales actuales para el tratamiento de enfermedades alérgicas de las vías respiratorias incluyen agonistas beta de duración corta o prolongada, y los corticosteroides inhalados o sistémicos cromolina y xantinas que tienen el potencial de producir efectos secundarios perjudiciales. La presente divulgación describe un nuevo enfoque terapéutico mecanístico basado en proteínas para el tratamiento de una enfermedad alérgica de las vías respiratorias y enfermedades asociadas con patología de Th2 excesiva. La presente divulgación se refiere al descubrimiento sorprendente de que el amiloide P sérico (SAP) demuestra un efecto terapéutico en el tratamiento de trastornos de hipersensibilidad.

45 El amiloide P sérico ("SAP") es una proteína sérica que se produce de manera natural en mamíferos compuesta por cinco subunidades o promotores idénticos que no se asocian covalentemente en una molécula similar a un disco. SAP es una glicoproteína pentamérica de 125.000 Dalton compuesta por cinco promotores de 25.000 Dalton no unidos covalentemente. SAP pertenece a la superfamilia de proteínas de pentraxina, caracterizada por esta estructura pentamérica cíclica. Las pentraxinas cortas clásicas incluyen SAP, así como proteína C reactiva (Osmand, A. P., *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 74:739-743 (1977)). Se sintetiza en el hígado y la semivida en suero fisiológico de SAP humano en seres humanos es de 24 horas. La secuencia de la subunidad de SAP humano se representa en la SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 20-223 del n.º de registro de Genbank NP_001630, secuencia señal no representada). El trabajo anterior ha demostrado que SAP se une a receptores de Fc para IgG (Fc γ R). La unión de SAP a Fc γ R proporciona una señal inhibitoria para diferenciación de fibrocitos, precursor de fibrocitos, precursor de miofibroblastos y/o precursor de monocitos hematopoyéticos.

55 Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", y similares, se refieren a obtener un

- efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en lo que se refiere a prevenir completa o parcialmente un trastorno o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en lo que se refiere a una cura parcial o completa para un trastorno de hipersensibilidad y/o efecto adverso atribuible al trastorno. “Tratamiento”, tal como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) aumento del tiempo de supervivencia; (b) disminución del riesgo de muerte debida a la enfermedad; (c) prevención de que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que todavía no se ha diagnosticado que la tiene; (d) inhibición de la enfermedad, es decir, detención de su desarrollo (por ejemplo, reducción de la velocidad de progresión de la enfermedad); y (e) alivio de la enfermedad, es decir, producción de regresión de la enfermedad.
- 5
- 10 Tal como se usa en el presente documento, un agente terapéutico que “inhibe” un trastorno o estado es un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o estado en la muestra tratada en relación con una muestra control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o estado en relación con la muestra control no tratada.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, un agente terapéutico que “previene” un trastorno o estado se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o estado en la muestra tratada en relación con una muestra control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o estado en relación con la muestra control no tratada.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, los términos “sujeto” y “paciente” se refieren a animales, incluyendo mamíferos, incluyendo seres humanos. El término “mamífero” incluye primates, animales domesticados incluyendo perros, gatos, ovejas, ganado, cabras, cerdos, ratones, ratas, conejos, cobayas, caballos, animales en cautividad tales como animales del zoo, y animales salvajes.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término “tejido” se refiere a un órgano o conjunto de células especializadas tales como tejido cutáneo, tejido pulmonar, tejido renal, fosa nasal, garganta y otros tipos de células.
- 30 El término “efecto terapéutico” se reconoce en la técnica y se refiere a un efecto local o sistémico en animales, particularmente en mamíferos, y más particularmente en seres humanos, producido por una sustancia farmacológicamente activa. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad de una sustancia de ese tipo que produce algún efecto local o sistémico deseado con una razón de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia de este tipo variará dependiendo del sujeto y del estado patológico que esté tratándose, del peso y la edad del sujeto, de la gravedad del estado patológico, de la manera de administración y similares, que puede determinarse fácilmente por un experto habitual en la técnica. Por ejemplo, determinadas composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse en una cantidad suficiente para producir un efecto deseado con una razón de beneficio/riesgo razonable aplicable a tal tratamiento.
- 35 Tal como se usa en el presente documento el término “enfermedades de hipersensibilidad” se refiere a trastornos producidos por las respuestas inmunitarias de huésped. Las enfermedades de hipersensibilidad incluyen enfermedades alérgicas-inmunitarias que resultan de una respuesta incontrolada o excesiva contra antígenos extraños, tales como microbios y alérgenos. Las reacciones de hipersensibilidad se han clasificado en cuatro categorías (tipos I-IV) basándose en el mecanismo inmunológico subyacente de la respuesta. La mayoría de las respuestas de hipersensibilidad (tipos I-III) están mediadas por anticuerpos, y estas reacciones pueden distinguirse por los diferentes tipos de antígenos reconocidos y por las clases de anticuerpo implicados. Las respuestas de tipo I están mediadas por IgE, un inductor potente de la activación de mastocitos. Las respuestas de tipo II y III están mediadas por IgG, que puede acoplarse a mecanismos efectores fagocíticos y mediados por complemento dependiendo de la subclase de IgG y de la naturaleza del antígeno. Las respuestas de tipo II se dirigen contra antígenos de la matriz o la superficie celular. Una categoría especial de respuestas de tipo II implica anticuerpos IgG contra receptores de la superficie celular que alteran las funciones normales del receptor, o bien produciendo una activación incontrolable o bien bloqueando la función del receptor. En las respuestas de tipo III, los anticuerpos se unen a antígenos solubles y forman complejos inmunitarios. Estos complejos de antígeno-anticuerpo pueden precipitar y depositarse dentro de diversos sitios de órganos y tejidos del huésped, particularmente en el bazo y el hígado. El daño tisular producido por las respuestas de tipo III se desencadena por el reconocimiento del complejo inmunitario sobre la superficie de las células huésped. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV están mediadas por células T y pueden subdividirse en tres grupos. En el primer grupo, la activación de macrófagos por células Th1 produce una respuesta inflamatoria que da como resultado daño tisular. En el segundo grupo, el daño está producido por una respuesta inflamatoria mediada por Th2 en la que predominan los eosinófilos. En el tercer grupo, el daño tisular al huésped está producido directamente por células T citotóxicas.
- 45
- 50
- 55 Tal como se usa en el presente documento, el término “hipersensibilidad inmediata” se define como el tipo de reacción inmunitaria que responde a enfermedades alérgicas que depende de IgE plus estimulación mediada por antígenos de tejidos, y mastocitos, y basófilos. Durante la respuesta de hipersensibilidad inmediata, los mastocitos y basófilos liberan mediadores que producen permeabilidad vascular aumentada, vasodilatación, contracción de músculo liso bronquial y visceral, e inflamación local.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “respuesta de asma alérgica” se refiere a una respuesta inflamatoria aguda de las vías respiratorias en un paciente asmático. El asma alérgica se caracteriza por limitación de flujo de aire reversible e hiperreactividad de las vías respiratorias. Estas respuestas normalmente están estimuladas por mecanismos de respuesta a alérgenos normales mediados por activación de células T Th2 CD4+ y posterior producción de citocinas de Th2. Sin embargo, las respuestas alérgicas asociadas con las vías respiratorias normalmente son más graves con una aparición aguda en pacientes con asma que la que se observa en pacientes no asmáticos. En particular, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 son importantes de manera crítica en respuestas agudas de asma alérgica, induciendo respuestas inflamatorias mediadas por eosinófilos, macrófagos y linfocitos, hipersecreción de moco e hiperreactividad de las vías respiratorias.

10 Tal como se usa en el presente documento, los pacientes con “asma crónica” se definen como pacientes que tienen cambios estructurales dentro de sus pulmones como consecuencia de respuestas al asma persistentes, a largo plazo. Los cambios estructurales incluyen hipertrofia e hiperplasia del músculo liso de las vías respiratorias, deposición de colágeno en membranas basales subepiteliales, hiperplasia de células caliciformes, engrosamiento de la mucosa de las vías respiratorias, un aumento de la vascularidad, y fibrosis. La remodelación tisular durante el asma crónica da como resultado obstrucción de las vías respiratorias que no es completamente reversible y por tanto conduce a pérdida progresiva de la función pulmonar a lo largo del tiempo.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “sistema respiratorio” se refiere a las características anatómicas de un mamífero que facilitan el intercambio de gases entre el entorno externo gaseoso y la sangre. El sistema respiratorio puede subdividirse en un tracto respiratorio superior y un tracto respiratorio inferior basándose en características anatómicas. El tracto respiratorio superior incluye las fosas nasales, la faringe y la laringe. Mientras que la tráquea, los bronquios primarios y los pulmones son partes del tracto respiratorio inferior. El sistema respiratorio también puede dividirse en zonas fisiológicas o funcionales. Estas incluyen la zona de conducción (la región para el transporte de gas desde la atmósfera exterior hasta justo por encima de los alveolos), la zona de transición y la zona respiratoria (la región alveolar donde se produce el intercambio de gases).

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico” se refiere a un polinucleótido tal como ácido desoxirribonucleico (ADN), y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). El término también debe entenderse que incluye, como equivalentes, análogos de o bien ARN o bien ADN compuestos por análogos de nucleótidos, y según sea aplicable para la realización que está describiéndose, polinucleótidos monocatenarios (tal como sentido o antisentido) y bicatenarios.

25 Los términos “péptidos”, “proteínas” y “polipéptidos” se usan de manera intercambiable en el presente documento. El término “proteína purificada” se refiere a una preparación de una proteína o proteínas que preferiblemente se aísla de, o en cualquier caso está sustancialmente libre de, otras proteínas asociadas normalmente con la(s) proteína(s) en una célula o lisado celular. El término “sustancialmente libre de otras proteínas celulares” (también denominado en el presente documento “sustancialmente libre de otras proteínas contaminantes”) se define como que engloba preparaciones individuales de cada una de las proteínas componentes que comprenden menos del 20% (en peso seco) de proteína contaminante, y preferiblemente comprenden menos del 5% de proteína contaminante. Las formas funcionales de cada una de las proteínas componentes pueden prepararse como preparaciones purificadas usando un gen clonado tal como se describe en los ejemplos adjuntos. Mediante “purificado”, quiere decirse, cuando se refiere a preparaciones de proteínas componentes usadas para generar una mezcla de proteínas reconstituida, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, tales como otras proteínas (particularmente otras proteínas que pueden enmascarar, disminuir, confundir o alterar sustancialmente las características de las proteínas componentes o bien como preparaciones purificadas o bien en su función en la mezcla reconstituida objeto). El término “purificado” tal como se usa en el presente documento, significa preferiblemente al menos el 80% en peso seco, más preferiblemente en el intervalo del 85% en peso, más preferiblemente el 95-99% en peso, y lo más preferiblemente al menos el 99,8% en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo presente (aunque pueden estar presentes agua, tampones y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tienen un peso molecular de menos de 5000). El término “puro” tal como se usa en el presente documento preferiblemente tiene los mismos límites numéricos que “purificado” inmediatamente anterior.

30 Los términos “compuesto”, “compuesto de prueba” y “agente activo” se usan en el presente documento de manera intercambiable y pretenden incluir, pero no se limitan a, polipéptidos, ácidos nucleicos, pequeñas moléculas y anticuerpos. “Molécula pequeña”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kD y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 2,5 kD, o incluso menos de 1 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, hidratos de carbono, lípidos u otras moléculas orgánicas (que contienen carbono) o inorgánicas (incluyendo, pero sin limitarse a, metales y compuestos organometálicos). Muchas compañías farmacéuticas tienen amplias bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas que comprenden matrices de moléculas pequeñas, a menudo extractos fúngicos, bacterianos o de algas, que pueden examinarse con cualquiera de los ensayos de la divulgación.

Métodos de tratamiento

60 Un aspecto de la divulgación proporciona métodos para tratar, inhibir o reducir la gravedad de un trastorno de

hipersensibilidad en un paciente, en el que los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de SAP a un paciente que necesita el mismo. En algunas realizaciones, la administración de un agonista de SAP reduce el número de días en que un paciente está aquejado de un trastorno de hipersensibilidad en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más días. La administración de un agonista de SAP puede inhibir la aparición de un trastorno de hipersensibilidad en un paciente en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más días.

Aunque los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar pacientes aquejados de un trastorno de hipersensibilidad, los métodos también pueden llevarse a cabo con pacientes que no tiene, pero que están en riesgo de desarrollar una respuesta de hipersensibilidad. En pacientes en riesgo de desarrollar un trastorno de hipersensibilidad, el tratamiento según la invención puede reducir la gravedad, inhibir el desarrollo, o prevenir la aparición de una respuesta de hipersensibilidad. La administración de un agonista de SAP puede reducir el número de días en que un paciente está aquejado de un trastorno de hipersensibilidad en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más días. La administración de un agonista de SAP puede inhibir la aparición de un trastorno de hipersensibilidad en un paciente en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más días.

En determinados métodos descritos en el presente documento, se administra un agonista de SAP a un paciente antes, durante y/o tras el tratamiento con una terapia que produce una respuesta de hipersensibilidad o que coloca a un paciente en riesgo de desarrollar un trastorno de este tipo. La terapia anti-hipersensibilidad puede usarse para tratar respuestas inmunitarias específicas de alergia, tales como anafilaxia, a diversos antígenos, incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, agentes anticonvulsivos, agentes quimioterápicos, heparina, insulina, protamina, aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos, relajantes musculares, agentes de inducción, narcóticos, coloides para la expansión del volumen intravascular, materiales de radiocontraste, hemoderivados y látex.

Otro aspecto de la divulgación proporciona métodos para tratar trastornos de hipersensibilidad mediante la administración conjunta de múltiples agonistas de SAP. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "administración conjunta" se refiere a cualquier forma de administración de dos o más compuestos terapéuticos diferentes de manera que el segundo compuesto se administra mientras que el compuesto terapéutico administrado anteriormente todavía es eficaz en el organismo (por ejemplo, los dos compuestos son eficaces simultáneamente en el paciente, lo que puede incluir efectos sinérgicos de los dos compuestos). Por ejemplo, los diferentes compuestos terapéuticos pueden administrarse o bien en la misma formulación o bien en formulaciones separadas, de manera o bien concomitante o bien secuencial. Por tanto, un individuo que recibe un tratamiento de este tipo puede beneficiarse de un efecto combinado de diferentes compuestos terapéuticos.

Otro aspecto de la solicitud proporciona métodos para tratar trastornos relacionados con hipersensibilidad mediante la administración conjunta de uno o más agonistas de SAP y un agente activo adicional. La terapia anti-hipersensibilidad puede englobar agentes que inhiben o antagonizan factores de pro-hipersensibilidad, tales como agentes que antagonizan uno o más factores de crecimiento o citocinas implicados en la formación y el mantenimiento de una respuesta de hipersensibilidad. De esta manera, puede usarse una terapia de anti-hipersensibilidad para antagonizar las actividades de células implicadas en hiperreactividad incluyendo células T Th2, mastocitos, basófilos, células B (plasma), eosinófilos, macrófagos y células dendríticas.

El agente activo puede ser un antagonista de factor de pro-hipersensibilidad y/o un agente anti-hipersensibilidad. Los factores de pro-hipersensibilidad que son dianas para los antagonistas como parte de la terapia de la presente invención pueden incluir, sin limitación, IL-4, IL-13, IL-5, IL-19, IL-15, IL-17A, IL-17E, IL-33, IL-21, TSLP, IgE, histamina, prostaglandinas alérgicas, cisteinil-leucotrienos, trombina, angiotensina, endotelina, PAF y otros factores que se sabe que promueven o mantienen trastornos de hipersensibilidad. El agente activo puede incluir anticuerpos dirigidos hacia uno o más factores de pro-hipersensibilidad.

El agente activo puede incluir antagonistas del receptor correspondiente de uno o más de los factores de pro-hipersensibilidad y/o citocinas, tales como fragmentos de los mismos.

El agente activo puede incluir inhibidores de rutas de señalización de receptores requeridas para la activación/proliferación de células efectoras inmunitarias, la liberación de mediadores inflamatorios, estallido oxidativo, fagocitosis y presentación de antígenos.

El agente activo puede incluir uno o más oligonucleótidos que contienen al menos una secuencia que es antisentido con respecto a uno o más de los factores de pro-hipersensibilidad y/o citocinas.

El agente activo puede incluir inhibidores de moléculas precursoras para histamina, prostaglandinas y cisteinil-leucotrienos.

El agente activo puede seleccionarse del grupo que consiste en corticosteroides, agonistas β 2 de duración prolongada y corta, cromolina y/o xantinas.

El agente activo puede incluir uno o más agonistas de IL-10, IL-12 y/o IFN- γ .

Un agonista de SAP para el tratamiento de un trastorno relacionado con hipersensibilidad puede administrarse

conjuntamente con inmunoterapia específica de alérgeno (SIT).

Otro aspecto de esta divulgación proporciona kits para tratar trastornos relacionados con hipersensibilidad que ponen en peligro uno o más agonistas de SAP. En algunas realizaciones, el kit puede incluir un agente activo adicional que va a administrarse conjuntamente con uno o más agonistas de SAP. El/los agonista(s) y el agente activo se formulan para administrarse conjuntamente. Los compuestos pueden administrarse por separado o en una formulación combinada. Los compuestos pueden administrarse simultáneamente o en programas de dosificación diferentes.

El agonista de SAP puede seleccionarse de una molécula pequeña, ácido nucleico o polipéptido. El agonista de SAP puede aumentar la señalización de SAP, imitar la señalización de SAP, aumentar la actividad de SAP, aumentar la expresión de SAP o aumentar los niveles séricos de SAP. El agonista de SAP puede ser un polipéptido de SAP, un anticuerpo frente a Fc γ R (anti-Fc γ RI, anti-Fc γ RII, anti-Fc γ RIII), un anticuerpo IgG agregado, o un anticuerpo IgG reticulado.

La administración de un agonista de SAP puede usarse para tratar trastornos de hipersensibilidad que incluyen rinitis alérgica, sinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, asma alérgica, eccema atópico, dermatitis, anafilaxia, alergias a alimentos, asma alérgica, eccema atópico, dermatitis, urticaria, anafilaxia, alergias a alimentos, reacciones alérgicas a veneno de insectos que pican y/o muerden, broncoconstricción alérgica, disnea alérgica, aumento alérgico de producción de moco en los pulmones, neumonitis y EPOC agravada u otra enfermedad pulmonar producida por respuesta inflamatoria aguda a alérgenos (por ejemplo, polen, partículas virales y hongos).

La administración de un agonista de SAP puede usarse para tratar un trastorno de hipersensibilidad en el que el trastorno de hipersensibilidad no es fibrosis.

La administración de un agonista de SAP puede usarse para tratar respuestas de asma alérgica en un paciente en el que el paciente no tiene asma crónica.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para producir una población celular enriquecida en células T reguladoras de una muestra que contiene células T. En algunas realizaciones, los métodos para producir una población celular enriquecida en células T reguladoras se efectúan *in vivo*. El método puede comprender obtener una muestra de un sujeto mamífero que comprende células T (por ejemplo, células CD4+) y poner en contacto las células T con SAP durante un periodo de tiempo suficiente para generar células T reguladoras. Las células T pueden aislarse de la muestra de mamífero antes de la exposición a SAP. Las células T reguladoras pueden aislarse de las otras células en el cultivo tras la exposición a SAP. Puede administrarse SAP a un paciente antes de obtener una muestra biológica que contiene células T del paciente.

El término "aislado" con respecto a células T se refiere a una preparación de población celular de forma que tenga al menos el 70, el 80, el 90, el 95, el 99 o el 100% de células T. Estas células T pueden ser el 70, el 80, el 90, el 95, el 99 o el 100% de células T reguladoras que producen FoxP3⁺ y/o IL-10. En algunos aspectos, se aísla una población celular deseada de otros componentes celulares, en algunos casos para excluir específicamente otros tipos celulares que pueden "contaminar" o interferir con el estudio de las células en aislamiento. Ha de entenderse, sin embargo, que una población celular "aislada" de este tipo puede incorporar tipos celulares adicionales que son necesarios para la supervivencia celular o para lograr los resultados deseados proporcionados por la divulgación. Por ejemplo, pueden estar presentes células presentadoras de antígeno, tales como monocitos (macrófagos) o células dendríticas, en una población celular "aislada" de células T o pueden añadirse a una población de células T aisladas para la generación de células T reguladoras. En algunos aspectos, las células presentadoras de antígeno pueden ser células dendríticas o monocitos activados. En algunos aspectos, las células presentadoras de antígeno se activan mediante la exposición a un agonista de SAP y/o antígeno estimulante.

Las células T de mamífero para su uso en los métodos de la divulgación pueden aislarse de una muestra biológica tomada de un sujeto mamífero. La muestra puede originarse de varias fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, sangre periférica, hemoderivado de leucaféresis, hemoderivado de aféresis, médula ósea, timo, biopsia tisular, tumor, tejido de ganglio linfático, tejido linfoide asociado con el intestino, mucosa asociada con tejido linfoide, sangre de cordón, hígado, sitios de lesiones inmunológicas (por ejemplo, líquido sinovial), páncreas y líquido cefalorraquídeo. El sujeto donante es preferiblemente un ser humano, y puede ser fetal, neonatal, niño, adulto y puede ser normal, enfermo o propenso a padecer una enfermedad de interés. Puede administrarse SAP al mamífero antes de aislar la muestra biológica.

La muestra de células T puede comprender células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de una muestra de sangre. Mediante "células mononucleares de sangre periférica" o "PBMC" quiere decirse linfocitos (incluyendo células T, células B, células NK, etc.) y monocitos. En general, las PBMC se aíslan de un paciente usando técnicas convencionales. Sólo pueden tomarse PBMC, o bien dejando o bien devolviendo sustancialmente todos los glóbulos rojos y los leucocitos polimorfonucleares al donante. Las PBMC pueden aislarse usando métodos conocidos en la técnica, tales como leucaféresis. En general, se realiza una etapa de leucaféresis de 5 a 7 litros, que retira esencialmente las PBMC de un paciente, devolviendo los componentes sanguíneos restantes. La recogida de la muestra se realiza preferiblemente en presencia de un anticoagulante (por ejemplo, heparina).

La muestra que contiene células T que comprende PBMC o células T aisladas puede tratarse previamente usando diversos métodos antes del tratamiento con SAP o un agonista de SAP. Generalmente, una vez recogidas, las células pueden concentrarse adicionalmente, si esto no se realizó simultáneamente con la recogida, o para purificar y/o concentrar adicionalmente las células. Por ejemplo, las PBMC pueden purificarse parcialmente mediante centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, a través de un gradiente de Ficoll-Hipaque). Las células aisladas de una muestra de donante se lavan normalmente para retirar las proteínas séricas y los componentes sanguíneos solubles, tales como autoanticuerpos, inhibidores, etc., usando técnica(s) bien conocida(s) en la técnica. Generalmente, esto implica la adición de un medio fisiológico o tampón, seguido por centrifugación. Esto puede repetirse según sea necesario. Las células pueden contarse entonces, y en general, se recogen desde 1×10^9 hasta 2×10^9 glóbulos blancos de una leucaféresis de 5-7 litros. Las células purificadas pueden resuspenderse en un medio o tampón adecuado para mantener la viabilidad. Las disoluciones adecuadas para la resuspensión serán generalmente una solución salina equilibrada (por ejemplo, solución salina normal, PBS, solución salina equilibrada de Hank, etc.) complementada opcionalmente con suero bovino fetal, BSA, HSA, suero de cabra normal, y/u otros factores que se producen de manera natural, conjuntamente con un tampón aceptable a baja concentración, generalmente desde 5-50 mM. Los tampones convenientes incluyen, pero no se limitan a, HEPES, tampones fosfato, tampones lactato, etc.

Un tipo celular específico (por ejemplo, células T efectoras, células T reguladoras, etc.) puede separarse de una mezcla de células compleja usando técnicas que enriquecen en células que tienen una característica deseada (por ejemplo, CD4+, FoxP3+, etc.). Los métodos de separación más convencionales usando técnicas de purificación por afinidad para obtener una población celular aislada sustancialmente. Las técnicas para la separación por afinidad pueden incluir, pero no se limitan a, separación magnética (por ejemplo, usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo), cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, complemento y citotoxinas), y "selección" con anticuerpos unidos a una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan separación precisa incluyen clasificación celular activada por fluorescencia, que puede tener diversos grados de complejidad, tales como múltiples canales de color, canales de impedancia, etc. Las células vivas pueden seleccionarse frente a células muertas empleando colorantes que se asocian con células muertas (por ejemplo, yoduro de propidio, LDS, etc.). Puede usarse cualquier técnica que no sea excesivamente perjudicial para la viabilidad de las células seleccionadas.

Los reactivos de afinidad usados pueden ser receptores o ligandos específicos para moléculas de la superficie celular (por ejemplo, CD4, CD25, etc.). Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden producirse por animales transgénicos, animales inmunizados, células B inmortalizadas y células transfectadas con vectores de ADN que codifican para el anticuerpo. Los detalles de la preparación de anticuerpos y su idoneidad para su uso como aglutinantes específicos los conocen bien los expertos en la técnica. Además de reactivos de anticuerpos, pueden usarse los pares péptido-antígeno de MHC y célula T-receptor, así como ligandos de péptidos, moléculas efectoras y receptoras.

Los anticuerpos usados como reactivos de afinidad para la purificación se conjugan generalmente con una etiqueta para su uso en separación. Las etiquetas pueden incluir perlas magnéticas (que permiten la separación directa), biotina (que puede retirarse con avidina o estreptavidina unida a un soporte), fluorocromos (que pueden usarse con un clasificador celular activado por fluorescencia), u otras etiquetas de este tipo que permiten facilidad de separación del tipo celular particular. Los fluorocromos pueden incluir ficobiliproteínas, tales como ficoeritrina y alofocianinas, fluoresceína y rojo Texas. Frecuentemente, cada anticuerpo se marca con un fluorocromo diferente para permitir la clasificación independiente de cada marcador.

Para la purificación de una población celular deseada, se añaden anticuerpos específicos de célula a una suspensión de células y se incuban durante un periodo de tiempo suficiente para unirse a los antígenos disponibles de la superficie celular. La incubación será habitualmente de al menos aproximadamente 5 minutos y habitualmente de menos de aproximadamente 30 minutos. Es deseable tener una concentración de anticuerpos suficiente en la mezcla de reacción, de manera que la eficacia de la separación no se limite por la carencia de anticuerpo (es decir, usando una cantidad saturante de anticuerpos). La concentración apropiada también puede determinarse mediante titulación. El medio en que se separan las células será cualquier medio que mantenga la viabilidad de las células. Un medio preferido es solución salina tamponada con fosfato que contiene desde el 0,1% hasta el 0,5% de BSA. Diversos medios están disponibles comercialmente y pueden usarse según la naturaleza de las células, incluyendo medio de Eagle modificado por Dulbecco, solución salina básica de Hank, solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, RPMI, medio de Iscove, PBS con EDTA 5 mM, etc., complementada opcionalmente con suero bovino fetal, BSA, HSA, etc.

La intensidad de tinción de las células puede monitorizarse mediante citometría de flujo, donde los láseres detectan niveles cuantitativos de fluorocromo (que es proporcional a la cantidad de antígeno de superficie celular unido a los anticuerpos). La citometría de flujo, o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), también puede usarse para separar poblaciones celulares basándose en la intensidad de tinción de anticuerpos, así como en otros parámetros tales como el tamaño celular y la dispersión de la luz. Aunque el nivel absoluto de tinción puede diferir con una preparación de anticuerpo y fluorocromo particular, los datos pueden normalizarse para un control.

Las células etiquetadas se separan entonces en cuanto a la expresión de un marcador designado (por ejemplo,

CD4, CD25, etc.). Las células separadas pueden recogerse en cualquier medio apropiado que mantenga la viabilidad de las células, que tenga habitualmente un colchón de suero en el fondo del tubo de recogida. Diversos medios están disponibles comercialmente y pueden usarse según la naturaleza de las células, incluyendo dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, medio de Iscove, etc., complementado frecuentemente con suero bovino fetal.

5 De esta manera se logran poblaciones celulares altamente enriquecidas en una característica deseada (por ejemplo, células T CD4+, células T reguladoras CD4+CD25+, etc.). La población deseada será del o aproximadamente del 70% o más de la composición celular, y habitualmente del o aproximadamente del 90% o más de la composición celular, y puede ser de hasta aproximadamente el 95% o más de la población celular. La población celular enriquecida puede usarse inmediatamente. Las células también pueden congelarse, aunque es preferible congelar las células antes del procedimiento de separación. Alternativamente, las células pueden congelarse a temperaturas de nitrógeno líquido y almacenarse durante periodos de tiempo prolongados, descongelándose y pudiendo reutilizarse. Las células se almacenarán habitualmente en DMSO y/o FCS, en combinación con medio, glucosa, etc. Una vez descongeladas, las células pueden expandirse mediante el uso de factores de crecimiento, antígeno, estimulación, células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas), etc. para proliferación y diferenciación.

En algunos aspectos, los presentes métodos son útiles para la generación de células T reguladoras *ex vivo* para trasplante en un paciente o desarrollo de modelos y ensayos *in vitro* para determinar la función de células T reguladoras. Los cultivos de células T reguladoras sirven como fuente valiosa de agentes farmacéuticos y factores reguladores novedosos. Los agentes terapéuticos de hipersensibilidad comunes se usan para bloquear los acontecimientos terminales de daño tisular o para dirigir los mediadores terminales de la respuesta de hipersensibilidad (por ejemplo, citocinas inflamatorias, IgE, etc.) pero generalmente no alteran la respuesta de hipersensibilidad subyacente. Aunque no se desea restringirse a la teoría, la estrategia de los métodos dados a conocer en el presente documento es producir la remisión restableciendo la función celular reguladora normal y "reajustando" el sistema inmunitario usando células T reguladoras obtenidas según la divulgación en el presente documento.

Una vez que las PBMC o células T aisladas se han sometido a cualquier tratamiento previo necesario, las células se tratan con SAP. Mediante "tratado" en el presente documento quiere decirse que las células se incuban en un medio nutritivo adecuado con SAP durante un periodo de tiempo suficiente para producir células T reguladoras que tienen la capacidad para inhibir respuestas inmunitarias mediadas por células T efectoras. En algunas realizaciones, el primer cultivo se diluye con aproximadamente un volumen igual de medio nutritivo. En otros aspectos, un primer cultivo celular se divide en dos o más partes que entonces se diluyen con medio nutritivo. La ventaja de la división del cultivo es que las agrupaciones de células formadas en el primer cultivo (miles de células) se alteran mecánicamente y forman agrupaciones de células más pequeñas (de decenas a cientos de células) durante la división del primer cultivo. Estas agrupaciones pequeñas pueden hacerse crecer entonces para dar agrupaciones más grandes durante el siguiente periodo de crecimiento. Un cultivo celular producido de este modo puede subcultivarse dos o más veces usando un método similar. El segundo cultivo o cualquier cultivo posterior puede estar sustancialmente libre de SAP, por ejemplo, el cultivo puede contener menos de 10 µg/ml, preferiblemente menos de 0,1 µg/ml, o más preferiblemente menos de 0,001 µg/ml. Un cultivo que está sustancialmente libre de SAP es uno en el que la concentración de SAP no es suficiente para promover la generación de células T reguladoras.

Una población celular puede hacerse crecer *in vitro* en diversas condiciones de cultivo. El medio de cultivo puede ser líquido o semisólido (por ejemplo, conteniendo agar, metilcelulosa, etc.). La población celular puede suspenderse convenientemente en cualquier medio nutritivo apropiado, incluyendo pero sin limitarse a, medio de Dulbecco modificado por Iscove, o RPMI-1640, complementado normalmente con suero bovino fetal (aproximadamente el 5-10%), L-glutamina y antibióticos (por ejemplo, penicilina y estreptomina).

El cultivo celular puede contener factores de crecimiento al que responden las células. Los factores de crecimiento, tal como se definen en el presente documento, son moléculas que pueden promover la supervivencia, el crecimiento y/o la diferenciación de células, o bien en cultivo o bien en el tejido intacto, a través de efectos específicos sobre un receptor transmembrana. Los factores de crecimiento incluyen factores polipeptídicos y no polipeptídicos. Los factores de crecimiento específicos que pueden usarse en el cultivo de las células objeto incluyen las interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, etc.) y antígenos (por ejemplo, antígenos peptídicos, antígenos proteicos tales como aloantígenos) preferiblemente en combinación con células presentadoras de antígeno, lectinas, estímulos no específicos (por ejemplo, Con A; LPS; etc.). El cultivo también puede contener anticuerpos (por ejemplo, anti-CD3), o ligandos específicos (en forma de ligando purificado, proteínas de fusión con Fc, u otras formas marcadas recombinantes como formas de cremallera de leucina) para receptores de la superficie celular que pueden estimular o inhibir la actividad de las células T reguladoras. Por ejemplo, pueden incluirse AcM o ligandos que se unen a TNFR u otras moléculas coestimuladoras en células T reguladoras y podrían estimular y aumentar la actividad de las células T reguladoras, invalidar la actividad de las células T reguladoras (e inducir proliferación), o que estimulan la apoptosis de las células T reguladoras. Las condiciones de cultivo específicas normalmente se escogen para lograr un fin particular (es decir, mantenimiento de la actividad de las células T reguladoras, expansión de la población de células T reguladoras, etc.). Las células T reguladoras pueden cocultivarse con células dendríticas maduras o inmaduras, así como con otras células presentadoras de antígeno (por ejemplo, monocitos, células B, macrófagos, etc.) antes

de, durante, o tras el tratamiento con SAP. Las células T reguladoras puede cocultivarse con otras poblaciones de células T. En algunos aspectos, el cultivo también contiene vitamina D3 y/o dexametasona, que se ha demostrado que promueven la generación de células T CD4+ reguladoras que producen IL-10 (Barrat *et al.* J. Exp. Med. 195(5): 2002, 603-616).

5 Pueden introducirse genes en las células T reguladoras antes del cultivo o el trasplante para una variedad de fines (por ejemplo, prevenir o reducir la sensibilidad a infección, reemplazar genes que tienen una mutación de pérdida de función, aumentar la potencia de las células T reguladoras para inhibir células Th, hacer que las células T reguladoras aniden en regiones específicas *in vivo*, etc.). Alternativamente, pueden introducirse vectores que expresan ARNm antisentido o ribozimas, bloqueando así la expresión de un gen no deseado. Otros métodos de
10 terapia génica incluyen la introducción de genes de resistencia a fármacos para permitir que las células trasplantadas tengan una ventaja y que se sometan a presión selectiva, por ejemplo el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR), o genes anti-apoptosis, tales como *bcl-2*. Pueden usarse diversas técnicas conocidas en la técnica para transfectar las células diana (por ejemplo, electroporación, ADN precipitado con calcio, fusión, transfección, lipofección, etc.). La manera particular en la que se introduce el ADN no es crítica para la práctica de la invención
15 siempre que no afecte a la viabilidad de las células.

Se dispone de muchos vectores útiles para transferir genes exógenos a células de mamífero. Los vectores pueden ser episomales (por ejemplo, plásmidos, vectores derivados de virus tales como citomegalovirus, adenovirus, etc.) o pueden integrarse en el genoma de la célula diana, a través de recombinación homóloga o integración al azar (es decir, retrovirus, incluyendo vectores derivados de lentivirus tales como VLMM, VIH-1, VLA, etc.)

20 Las células T reguladoras generadas mediante los métodos de la divulgación pueden trasplantarse o reintroducirse de nuevo en el paciente. Los métodos para transferencia adoptiva de células T reguladoras están bien descritos en la técnica, por ejemplo, véanse las solicitudes de patente estadounidense 2006/0115899, 2005/0196386, 2003/0049696, 2006/0292164 y 2007/0172947. Por tanto, un médico experto podría trasplantar o reintroducir fácilmente las células T reguladoras producidas mediante los métodos de la presente divulgación en un paciente que
25 necesita las mismas. Las células T trasplantadas pueden originarse a partir de una muestra de células T obtenida del propio paciente o de otro donante que no recibe tratamiento. Esto se realiza generalmente tal como se conoce en la técnica y habitualmente comprende inyectar, u otros métodos de introducción, las células tratadas de nuevo en el paciente a través de administración intravenosa. Por ejemplo, las células pueden colocarse en una bolsa de infusión Fenwall de 50 ml mediante inyección usando jeringas estériles u otros mecanismos de transferencia estériles. Las células pueden infundirse entonces inmediatamente a través de administración i.v. a lo largo de un
30 periodo de tiempo, en una vía i.v. de flujo libre en el paciente. En algunos aspectos, pueden añadirse también reactivos adicionales tales como tampones o sales.

Las células T reguladoras generadas mediante los métodos de la divulgación pueden usarse para tratar o prevenir un trastorno o estado de hipersensibilidad en un paciente mediante la administración de una cantidad
35 terapéuticamente eficaz de las células T reguladoras a un paciente que necesita las mismas. Las células T reguladoras de la divulgación pueden promover la supresión mediada por células T reguladoras de trastornos o estados de hipersensibilidad. La administración de células T reguladoras, generadas mediante los métodos de la divulgación, puede reducir el número de días en que un paciente está aquejado de un trastorno de hipersensibilidad en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, o más días. La administración de células T reguladoras, generadas
40 mediante los métodos de la divulgación, puede inhibir la aparición de un trastorno de hipersensibilidad en un paciente en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más días.

Aunque los métodos pueden usarse para tratar pacientes aquejados de un trastorno de hipersensibilidad, los métodos también pueden aplicarse a pacientes que no tienen, pero que están en riesgo de desarrollar una respuesta de hipersensibilidad. En pacientes en riesgo de desarrollar un trastorno de hipersensibilidad, el tratamiento con
45 células T reguladoras, generadas mediante los métodos de la divulgación, puede reducir el número de días en que un paciente está aquejado de o inhibir la aparición de un trastorno de hipersensibilidad en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, o más días. El tratamiento con células T reguladoras, generadas mediante los métodos de la divulgación, puede prevenir un trastorno de hipersensibilidad en un paciente en riesgo de desarrollar una enfermedad de este tipo. En determinados aspectos de la divulgación, las células T reguladoras se administran a un
50 paciente antes, durante y/o tras el tratamiento con una terapia que produce una respuesta de hipersensibilidad o que coloca a un paciente en riesgo de desarrollar un trastorno de este tipo. La respuesta de hipersensibilidad puede ser una respuesta inmunitaria adversa en un paciente que se ha sometido, o que se someterá, a un trasplante de órgano o tejido (por ejemplo, enfermedad de injerto contra huésped).

Otro aspecto de la divulgación proporciona métodos para tratar trastornos relacionados con hipersensibilidad mediante la administración conjunta de células T reguladoras y al menos un agente activo adicional. El agente activo
55 adicional puede ser un agente terapéutico usado para tratar o prevenir una enfermedad de hipersensibilidad: anticuerpos anti-IgE, agonista de Th1, antagonistas de Th2, agonistas beta a corto y largo plazo, corticosteroides, cromolina, xantinas e inmunoterapia específica de alérgeno. El agente activo puede ser un inhibidor de mastocitos, histamina, prostaglandinas, quimiocinas, mediadores de Th1 y Th2, y cisteinil-leucotrienos. Las citocinas adecuadas para administración conjunta pueden incluir, pero sin limitarse a IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, TGF- β , IL-15 y/o IL-17. El agente activo adicional puede ser una población celular distinta de células T reguladoras. Por ejemplo, las células T
60

reguladoras pueden administrarse conjuntamente a un paciente que necesita las mismas con uno o más tipos de células presentadoras de antígeno, tales como monocitos o células dendríticas. En algunos aspectos, estas células presentadoras de antígeno pueden ser células dendríticas o monocitos activados. En algunos aspectos, las células presentadoras de antígeno se activan mediante la exposición a un antígeno estimulante y/o agonistas de SAP. El agente activo adicional puede ser un agonista de SAP. En determinados aspectos, los métodos para tratar trastornos relacionados con hipersensibilidad comprenden la administración conjunta de células T reguladoras, al menos un agonista de SAP, y uno o más agentes activos adicionales. Los agentes activos adicionales pueden administrarse periódicamente.

Cualquier método de tratamiento de la divulgación puede repetirse según sea necesario o se requiera. Por ejemplo, el tratamiento puede realizarse periódicamente. La frecuencia de administración del tratamiento puede determinarse por un experto en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento puede administrarse una vez a la semana durante un periodo de semanas, o múltiples veces a la semana durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 3-5 veces a lo largo de un periodo de dos semanas). Generalmente, la mejora de los síntomas de la enfermedad de hipersensibilidad persiste durante algún periodo de tiempo, preferiblemente al menos meses. A lo largo del tiempo, el paciente puede experimentar una recaída de los síntomas, punto en el cual los tratamientos pueden repetirse.

Tras trasplantar las células en el paciente, puede evaluarse el efecto del tratamiento, si se desea. Un experto en la técnica reconocería que hay muchos métodos de evaluar las manifestaciones inmunológicas de una enfermedad de hipersensibilidad (por ejemplo, cuantificación de títulos de anticuerpos totales o de inmunoglobulinas específicas, pruebas de la función renal, evaluación del daño tisular, etc.). También pueden realizarse pruebas de la función de las células T tales como números, fenotipo, estado de activación y capacidad de las células T para responder a antígenos y/o mitógenos.

La divulgación también proporciona kits para tratar o prevenir trastornos relacionados con hipersensibilidad que comprenden uno o más agonistas de SAP. El kit puede incluir un agente activo adicional que va a administrarse conjuntamente con uno o más agonistas de SAP. El agente adicional puede ser un agente terapéutico usado para tratar o prevenir una enfermedad de hipersensibilidad. Los agentes activos descritos en el presente documento pueden incluir, pero sin limitarse a interferones beta, corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, bloqueantes de necrosis tumoral, fármacos antipalúdicos, ciclosporinas, inhibidores alfa de necrosis tumoral, inmunosupresores, inmunomoduladores, citocinas, agentes terapéuticos anti-rechazo de injerto, y agentes terapéuticos de anticuerpos. Las citocinas adecuadas para administración conjunta pueden incluir, pero sin limitarse a IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β , IL-15 y/o IL-17. En determinados aspectos, el agente activo adicional es una población de células T reguladoras. El/los agonista(s) y agentes activos adicionales pueden formularse para administrarse conjuntamente. Los agentes activos del kit pueden administrarse por separado o en una formulación de combinación. Los agentes activos pueden administrarse simultáneamente o en programas de dosificación diferentes.

La memoria descriptiva proporciona además kits para la práctica de los métodos descritos en el presente documento (es decir, la incubación de células con el SAP para generar células T reguladoras). El kit puede tener varios componentes. En algunos aspectos, el kit puede comprender un recipiente de tratamiento celular que está adaptado para recibir células de un paciente. El paciente puede ser un donante normal o un paciente aquejado de un trastorno de hipersensibilidad u otro estado. El recipiente debe ser estéril. En algunas realizaciones, el recipiente de tratamiento celular se usa para la recogida de las células, por ejemplo puede estar adaptado para engancharse a una máquina de leucaféresis usando un orificio de entrada. En otras realizaciones, puede usarse un recipiente de recogida de células independiente. El kit también puede estar adaptado para su uso en un sistema cerrado automatizado para purificar subconjuntos de células T específicas y expandirlas para transferirlas de nuevo al paciente.

La forma y la composición del recipiente de tratamiento celular pueden variar, tal como apreciarán los expertos en la técnica. Generalmente, el recipiente puede estar en varias formas diferentes, incluyendo una bolsa flexible, similar a una bolsa i.v., o un recipiente rígido similar a un vaso de cultivo celular. Puede estar configurado para permitir la agitación. Generalmente, la composición del recipiente será cualquier material adecuado, biológicamente inerte (por ejemplo, vidrio o plástico, por ejemplo, polipropileno, polietileno, etc.) El recipiente de tratamiento celular puede tener uno o más orificios de entrada o salida, para la introducción o la retirada de células, reactivos, composiciones reguladoras, etc. Por ejemplo, el recipiente puede comprender un orificio de toma de muestras para la retirada de una fracción de las células para su análisis antes de su reintroducción en el paciente. De manera similar, el recipiente puede comprender un orificio de salida para permitir la introducción de las células en el paciente; por ejemplo, el recipiente puede comprender un adaptador para su unión a una configuración i.v.

El kit comprende además al menos una dosis de una composición que comprende un agonista de SAP y opcionalmente uno o más agentes activos adicionales (por ejemplo, citocinas, mitógenos, etc.). Los componentes pueden usarse como dosis separadas o combinadas. Por ejemplo, SAP puede combinarse con al menos una o más citocinas y/o uno o más mitógenos. El kit también puede contener al menos una dosis de una segunda composición reguladora que contiene una o más citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-10, IL-15, IL-17, etc.), mitógenos o agentes activos adicionales. En algunas realizaciones, el agente activo adicional puede ser un agente terapéutico usado para tratar o prevenir una enfermedad de hipersensibilidad. Los agentes activos del kit pueden incluir, pero sin limitarse a anticuerpos anti-IgE, agonista de Th1, antagonistas de Th2, agonistas beta a corto y largo plazo, corticosteroides,

cromolina, xantinas, e inmunoterapia específica de alérgeno. El agente activo del kit puede ser un inhibidor de mastocitos, histamina, prostaglandinas, quimiocinas, mediadores de Th1 y Th2, y cisteinil-leucotrienos. Las citocinas adecuadas para administración pueden incluir, pero sin limitarse a IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β , IL-15 y/o IL-17, agentes terapéuticos de hipersensibilidad.

5 El kit también puede contener al menos una dosis de medio nutritivo para diluir el primer cultivo y/o para disolver componentes liofilizados del kit. "Dosis" en este contexto significa una cantidad de la composición que es suficiente para producir un efecto (es decir, expansión inducida por agonista de SAP de células T reguladoras). En algunos casos, pueden incluirse dosis múltiples. La dosis puede añadirse al recipiente de tratamiento celular usando un orificio; alternativamente, en una realización preferida, la primera composición reguladora ya está presente en el
10 recipiente de tratamiento celular. Las composiciones reguladoras y/o el medio nutritivo pueden liofilizarse para su estabilidad, y se reconstituyen usando medio nutritivo, u otros reactivos. El kit puede comprender adicionalmente al menos un reactivo, incluyendo tampones, sales, medio, proteínas, fármacos, etc. Por ejemplo, pueden incluirse mitógenos, anticuerpos monoclonales y perlas magnéticas tratadas para separación de células. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones escritas para usar los kits.

15 Trastornos relacionados con hipersensibilidad

La mayoría de los trastornos de hipersensibilidad se caracterizan como respuestas incontroladas o excesivas contra antígenos extraños que dan como resultado lesión tisular. El trastorno de hipersensibilidad puede ser sistémico o local. Los trastornos de hipersensibilidad que pueden susceptibles de tratamiento con el método objeto son enfermedades mediadas por Th2 que incluyen, pero sin limitarse a, rinitis alérgica, sinusitis alérgica, conjuntivitis
20 alérgica, broncoconstricción alérgica, disnea alérgica, aumento alérgico en la producción de moco en los pulmones, eccema atópico, dermatitis, urticaria, anafilaxia, neumonitis, y asma alérgica.

La composición de terapia anti-hipersensibilidad puede usarse para tratar respuestas inmunitarias específicas de alérgenos, tales como anafilaxia, a diversos antígenos, incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos (por ejemplo, cefalosporinas, sulfonamidas, penicilina y otras β -lactama), agentes anticonvulsivos (por ejemplo, fenitoína, fenobarbital, carbamazepina, dapsona, alopurinol y minociclina), agentes quimioterápicos (por ejemplo, taxanos, compuestos de platino, asparaginasas y epipodofilotoxinas), heparina, insulina, protamina, aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos, relajantes musculares (por ejemplo, succinilcolina, atracurio, vecuronio y pancuronio), agentes de inducción (por ejemplo barbitúricos, etomidato, propofol), narcóticos (por ejemplo, fentanilo, meperidina, morfina), coloides para expansión de volumen intravascular, materiales de radiocontraste,
25 hemoderivados, látex, productos animales, caspa de animales, ácaros del polvo, insectos (por ejemplo, mordeduras, picaduras o veneno), productos cosméticos, metales (por ejemplo, níquel, cobalto y cromato), plantas, esporas, polen, alimentos (por ejemplo, leche, huevos, trigo, soja, cacahuetes y frutos secos, marisco), vacunas, y antígenos fúngicos (por ejemplo, las especies alérgicas comunes incluyen *Aspergillus*, *Curvularia*, *Exserohilum* y *Alternaria*).

Las composiciones de terapia anti-hipersensibilidad pueden aplicarse de manera local o sistémica. Las composiciones también pueden suministrarse en combinaciones o con cofactores.
35

Las composiciones de terapia anti-hipersensibilidad pueden suministrarse a una ubicación diana a partir de una fuente exógena, o pueden obtenerse *in vivo* mediante células en la ubicación diana o células en el mismo organismo que la ubicación diana.

Las composiciones de terapia anti-hipersensibilidad pueden estar en cualquier formulación fisiológicamente apropiada. Pueden administrarse a un organismo mediante inyección, por vía tópica, mediante inhalación, por vía oral o mediante cualquier otro medio eficaz.
40

Las mismas composiciones y metodologías descritas anteriormente para suprimir o inhibir respuestas de hipersensibilidad excesivas también pueden usarse para suprimir o inhibir respuestas de hipersensibilidad inapropiadas. Por ejemplo, pueden tratar, inhibir o reducir un estado que se produce en el sistema respiratorio, los ojos, la piel, la boca, el tracto gastrointestinal, o por vía sistémica.
45

Asma alérgica

El asma alérgica es una enfermedad inflamatoria caracterizada por limitación reversible del flujo de aire e hiperreactividad de las vías respiratorias. La inflamación persistente en tejido de las vías respiratorias puede conducir a cambios estructurales conocidos como remodelación de las vías respiratorias y por consiguiente a la obstrucción de las vías respiratorias. Los cambios estructurales observados en el asma crónica persistente, que incluyen hipertrofia del músculo liso de las vías respiratorias e hiperplasia, hiperplasia de células calciformes, engrosamiento de la mucosa de las vías respiratorias y un aumento en la vascularidad, se derivan de la inflamación de las vías respiratorias. Se cree en general que la inflamación de las vías respiratorias produce finalmente lesión tisular y cambios estructurales posteriores conocidos como remodelación de las vías respiratorias en pacientes con
50 asma. Una consecuencia de la inflamación prolongada es el engrosamiento de la pared de las vías respiratorias. En determinadas realizaciones, la terapia anti-hipersensibilidad de la presente invención puede usarse para tratar respuestas de asma alérgica en un paciente, reduciendo la inflamación de las vías respiratorias y previniendo de ese modo la remodelación de las vías respiratorias.
55

Hay muchos factores inflamatorios producidos por las células epiteliales de las vías respiratorias, y el daño epitelial participa en los procesos pro-inflamatorios a través de citocinas, factores de crecimiento y mediadores en pacientes con asma. Los factores que contribuyen a la remodelación directamente son el factor de crecimiento transformante (TGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1), endotelina-1 (ET-1) y factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). El moco de las vías respiratorias normalmente protege la superficie epitelial de lesiones y facilita la retirada de desechos bacterianos, celulares y particulados de los pulmones. La producción excesiva de moco también es una característica importante del asma alérgica y crónica y contribuye sustancialmente a la morbilidad. Las células calciformes y las glándulas submucosas secretan moco, y una alta proporción de células calciformes y un agrandamiento de las glándulas submucosas está asociada con hipersecreción de moco, lo que puede dar como resultado el estrechamiento de la luz de las vías respiratorias y por tanto, el agravamiento de la obstrucción de las vías respiratorias.

Los estudios en modelos de asma alérgica implican el papel de las citocinas de Th2, en particular IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 en metaplasia de células calciformes. IL-13 aumenta la proporción de células secretoras, producida por la sobreexpresión de MUC5AC en las propias células, y por consiguiente la morfología alterada de las células epiteliales en las células epiteliales de las vías respiratorias. Además, se ha mostrado que IL-13 induce metaplasia de células calciformes y producción de mucina MUC5AC en el epitelio de las vías respiratorias, lo que sugiere que estos efectos pueden atribuirse a la activación de EGFR por neutrófilos reclutados en las vías respiratorias.

Los pacientes de asma alérgica también tienen un nivel elevado de STAT-6 en el epitelio de las vías respiratorias. Otras moléculas candidatas asociadas con hiperplasia de células calciformes son el canal 1 de cloruro activado por Ca^{2+} humano (CLCA1) y la anfiregulina. Estudios recientes han demostrado que la expresión del gen de CLCA1 está regulada por incremento en células calciformes en pacientes con asma alérgica y que la anfiregulina, uno de los EGF, producida por la estimulación de FcεRI de mastocitos potencia la expresión de ARNm de mucina en el epitelio de las vías respiratorias.

Un aumento en la masa del músculo liso de las vías respiratorias es la característica más prominente de la remodelación de las vías respiratorias en el asma crónica. La proliferación del músculo liso consiste en hipertrofia, el aumento en tamaño del músculo liso de las vías respiratorias, e hiperplasia, el aumento en el número de células del músculo liso de las vías respiratorias. El aumento en la masa de músculo liso es desproporcionado con respecto al aumento en el grosor de la pared de las vías respiratorias. Estudios recientes sugieren que las células del músculo liso de las vías respiratorias podrían modular la remodelación de las vías respiratorias mediante la secreción de citocinas, factores de crecimiento, o proteínas de la matriz y mediante la expresión de moléculas de adhesión celular y otras moléculas coestimuladoras potenciales. Los principales factores para la proliferación del músculo liso de las vías respiratorias incluyen EGF, PDGF, TNF- α , triptasa, histamina y serotonina, y los principales factores inhibidores incluyen heparina, agonista β y corticosteroides.

En las vías respiratorias asmáticas crónicas, la hiperplasia del músculo liso de las vías respiratorias es un mecanismo importante que conduce a masa de músculo liso aumentada, y se cree que la hiperplasia del músculo liso depende de la estimulación de la mitosis y la supresión de la apoptosis. Puede haber al menos tres rutas de transducción de señales principales asociadas con la proliferación del músculo liso de las vías respiratorias: 1) tirosina cinasa receptora (RTK), que se estimula por PDGF, EGF, bFGF e IgF, 2) receptor acoplado a proteínas G (GPCR), que se estimula por tromboxano A_2 , histamina, ET-1 y LTD $_4$, y 3) receptor de citocina que se estimula por IL-6 y TNF α .

Varias citocinas, especialmente las citocinas de Th2, tienen un papel directo en la propagación de los procesos inflamatorios del asma alérgico. IL-13 es importante de manera crítica en modelos agudos de inflamación alérgica, induciendo respuestas inflamatorias mediadas por eosinófilos, macrófagos y linfocitos, fibrosis subepitelial, hipersecreción de moco, e hiperreactividad de las vías respiratorias. Estos efectos se derivan probablemente de la ruta de señalización de STAT-6.

Enfermedad ocular inflamatoria

Las composiciones anti-hipersensibilidad de la divulgación pueden usarse para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad ocular inflamatoria. (Véase, por ejemplo, Sugita *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci 2009; Sugita *et al.* J Immunol. 183(8): 5013-22, 2009; Gregerson *et al.* J Immunol. 183(2) 814-22, 2009; Matta *et al.* Am J Pathol. 173(5): 1440-54, 2008; Siemasko *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 49(12): 5434-40, 2008; Caspi, R. Immunol Res. 42(1-3): 41-50, 2008; Nanke *et al.* Mod Rheumatol. 18(4): 354-8, 2008; Agarwal *et al.* J Immunol. 180(8): 5423-9, 2008; Ng *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 48(11): 5122-7, 2007; y Silver *et al.* J. Immunol. 179(8): 5146-58, 2007). En particular, las composiciones anti-hipersensibilidad de la divulgación pueden usarse para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la uveítis y/o la uveorretinitis. (Véase, por ejemplo, Commodaro *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009; Sun *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 51(2): 816-21, 2010; Yeh *et al.* Arch Ophthalmol, 127(4): 407-13, 2009; y Ke *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 49(9): 3999-4007). Por ejemplo, las composiciones de la divulgación pueden usarse para tratar uveítis anterior granulomatosa, que resulta de una infección (por ejemplo, VHS, VZV, etc.), cáncer o trastorno autoinmunitario (por ejemplo, granulomatosis de Wegener); uveítis anterior no granulomatosa, particularmente en asociación con queratitis, escleritis, atrofia de iris, artralgia, o cáncer; uveítis intermedia, que

resulta de infección, cáncer, artritis reumatoide juvenil, esclerosis múltiple, sarcoidosis, pars plana, vitritis, o uveítis periférica; uveítis posterior, particularmente en asociación con hemorragia retiniana, desprendimiento de retina neurosensorial, retinitis focal, edema del disco óptico, o vasculitis retiniana; o complicaciones que resultan de uveítis (por ejemplo, desprendimiento de retina, desprendimiento coroidal, opacificación vítrea, glaucoma, queratopatía en banda calcificada o cataratas). En determinados aspectos, las composiciones anti-hipersensibilidad de la divulgación pueden usarse para tratar, prevenir o reducir la gravedad de enfermedades de xeroftalmia incluyendo, por ejemplo, deficiencia lagrimal acuosa (por ejemplo, Sjogrens), disfunción por producción lagrimal evaporativa (por ejemplo, sarcoidosis), así como trastornos estructurales y exógenos (por ejemplo, queratoconjuntivitis límbica). (Véase, por ejemplo, Chauhan *et al.* J Immunol. 182(3): 1247-52, 2009). En determinados aspectos, las composiciones anti-hipersensibilidad de la divulgación pueden usarse para tratar, prevenir o reducir la gravedad de trastornos de conjuntivitis alérgica. (Véase, por ejemplo, Sumi *et al.* Int Arch Allergy Immunol. 148(4): 305-10, 2009; Niederkorn J. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 8(5): 472-6, 2008; y Fukushima *et al.* Allergol Int. 57(3): 241-6, 2008). En determinados aspectos, las composiciones anti-hipersensibilidad de la divulgación pueden usarse para tratar, prevenir o reducir la gravedad de enfermedades oculares inflamatorias asociadas con trasplante de córnea. (Véase, por ejemplo, Jin *et al.* Invest Ophthalmol vis Sci. 51(2): 816-21, 2010; y Chauhan *et al.* J Immunol. 182(1): 143-53, 2009). En determinados aspectos, las composiciones anti-hipersensibilidad de la divulgación pueden usarse para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad ocular inflamatoria asociada con un trastorno neoplásico. En determinados aspectos, las composiciones anti-hipersensibilidad de la divulgación pueden usarse para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad ocular inflamatoria asociada con un trastorno congénito.

20 Agentes terapéuticos anti-hipersensibilidad

Agonistas de SAP

Un aspecto de la divulgación proporciona agonistas de SAP útiles en el tratamiento de diversos trastornos, en particular, trastornos de hipersensibilidad. Los agonistas de SAP engloban todos los compuestos y composiciones que aumentan o imitan de otro modo la señalización de SAP endógena, incluyendo compuestos que aumentan la actividad de SAP.

(i) Amiloide P sérico humano

Según la invención, un agonista de la señalización de SAP es un polipéptido de SAP. En determinadas realizaciones, un polipéptido de SAP es SAP que comprende cinco protómeros de SAP humanos (SEQ ID NO: 1). Se pretende que el término "protómero de SAP" se refiere a un polipéptido que es idéntico en al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 99% o el 100% al protómero de SAP humano, tal como se determina usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990)). En un aspecto específico, los parámetros empleados para calcular la identidad en porcentaje y la similitud de una alineación de aminoácidos comprenden: Matriz=PAM 150, k-tupla=2, penalización por apareamiento erróneo =1, penalización por unión =20, longitud de grupo de aleatorización =0, puntuación de corte =1, penalización por hueco =5 y penalización por tamaño de hueco = 0,05. El término "promotor de SAP" engloba fragmentos funcionales y proteínas de fusión que comprenden cualquiera de los anteriores. Generalmente, un promotor de SAP se diseñará para que sea soluble en disoluciones acuosas a temperaturas, niveles de pH y osmolaridad biológicamente relevantes. Los promotores que se asocian no covalentemente entre sí para formar SAP pueden tener secuencias de aminoácidos y/o modificaciones postraduccionales idénticas o, alternativamente, los promotores individuales pueden tener secuencias y/o modificaciones diferentes.

Algunos aspectos de la memoria descriptiva proporcionan polipéptidos, o proporcionan métodos terapéuticos para emplear estos polipéptidos, en los que dichos polipéptidos se definen, al menos en parte, para una secuencia de referencia. Por consiguiente, tales polipéptidos pueden tener un determinado porcentaje de residuos de aminoácido que no son idénticos a una secuencia de referencia. En algunas realizaciones, los residuos no idénticos tienen propiedades químicas similares a los residuos a los que no son idénticos. Los grupos que tienen propiedades similares incluyen los siguientes aminoácidos: E, D, N, y Q; H, K, y R; Y, F y W; I, L, V, M, C, y A; y S, T, C, P y A.

En algunos aspectos, los residuos que no son idénticos son aquellos que no están conservados evolutivamente entre la secuencia de referencia y una secuencia ortóloga en al menos una especie relacionada evolutivamente, tal como en especies dentro del mismo orden. En el caso de una secuencia de referencia de vertebrados, los aminoácidos que pueden mutarse en una realización preferida son aquellos que no están conservados entre la secuencia de referencia y la secuencia ortóloga en otra especie de vertebrados. Por ejemplo, si se dice que un polipéptido usado en un método de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95% a SAP humano (SEQ ID NO: 1), entonces dicho polipéptido puede tener residuos no idénticos a aquellas posiciones en las que difieren el SAP humano y el de otro vertebrado. La figura 1 representa el SAP humano alineado frente a dos secuencias de SAP de mamífero y una de ave. Los residuos no sombreados indican residuos que difieren de la secuencia de SAP humano.

Los polipéptidos que comparten una identidad de al menos el 95% con SEQ ID NO: 1 incluyen polipéptidos que tienen sustituciones conservativas en esas zonas de divergencia. Consideradas normalmente como sustituciones

conservativas son los reemplazos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e ILe, el intercambio de los residuos hidroxilo Ser y Thr, el intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu, la sustitución entre los residuos de amida Asn y Gln, el intercambio de los residuos básicos Lys y Arg y los reemplazos entre los residuos aromáticos Phe, Tyr. Puede encontrarse una guía adicional respecto a qué cambios de aminoácidos es probable que sean fenotípicamente silenciosos en Bowie *et al.*, Science 247:1306-1310 (1990).

Los polipéptidos de SAP normalmente comprenden polímeros que son idénticos en al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, o al menos el 99% a la SEQ ID NO. 1.

Según la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden SAP. En algunos aspectos, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una variante de SAP. La secuencia de aminoácidos de una variante de SAP puede diferir de SEQ ID NO: 1 en una o más sustituciones conservativas. Tal como se usa en el presente documento, "sustituciones conservativas" son residuos que son física o funcionalmente similares a los residuos de referencia correspondientes, es decir, una sustitución conservativa y su residuo de referencia tienen tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas similares incluyendo la capacidad para formar uniones covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservativas preferidas son aquellas que cumplen los criterios definidos para una mutación puntual aceptada en Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 (1978 & Supp.). Ejemplos de sustituciones conservativas son sustituciones dentro de los siguientes grupos: (a) valina, glicina; (b) glicina, alanina; (c) valina, isoleucina, leucina; (d) ácido aspártico, ácido glutámico; (e) asparagina, glutamina; (f) serina, treonina; (g) lisina, arginina, metionina; y (h) fenilalanina, tirosina. Puede encontrarse una guía adicional respecto a qué cambios de aminoácido es probable que sean fenotípicamente silenciosos en Bowie *et al.*, Science 247:1306-1310 (1990).

Variantes y fragmentos de SAP que conservan la función biológica son útiles en las composiciones farmacéuticas y métodos descritos en el presente documento. En algunos aspectos, una variante o fragmento de SAP se une a Fc γ RI, Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIB. En algunas realizaciones, se usa una variante o fragmento de SAP para tratar o prevenir un trastorno o estado autoinmunitario.

También se describen composiciones que contienen SAP, variantes de SAP o fragmentos funcionales de SAP que pueden funcionar para elevar la concentración de SAP en ubicaciones diana hasta aproximadamente al menos 0,5 μ g/ml. Un fragmento funcional de SAP es una parte del polipéptido de SAP que conserva la actividad de SAP nativo. En seres humanos, se ha administrado previamente SAP radiomarcado con ¹²⁵I a pacientes de estudio con amiloidosis. En los tratamientos, se administraron aproximadamente 600 μ g de SAP a un ser humano adulto. Por consiguiente, la administración de aproximadamente 600 μ g de SAP por vía sistémica a un ser humano adulto es seguro. También pueden ser seguras dosificaciones superiores en condiciones apropiadas.

(ii) Anticuerpos anti-Fc γ R como agonistas de SAP

En un aspecto descrito en el presente documento, se proporcionan uno o más compuestos que imitan la señalización de SAP. En algunos aspectos, los agonistas de la señalización de SAP son anticuerpos anti-Fc γ R, en los que los anticuerpos se seleccionan de una clase de anticuerpos de anti-Fc γ RI, anti-Fc γ RIIA y anti-Fc γ RIII que pueden unirse a o bien Fc γ RI, Fc γ RIIA o bien Fc γ RIII, respectivamente. Los anticuerpos anti-Fc γ R son anticuerpos IgG que se unen a receptores para la parte Fc de los anticuerpos IgG (Fc γ R). Los anticuerpos anti-Fc γ R se unen a través de su región variable y no a través de su región constante (Fc). Los anticuerpos anti-Fc γ R pueden incluir cualquier isotipo de anticuerpo. Los anticuerpos anti-Fc γ R pueden reticularse o agregarse adicionalmente con o sin anticuerpos adicionales u otros medios. Este proceso inicia acontecimientos de señalización intracelular compatibles con la activación de Fc γ R. En algunas realizaciones, el agonista de la señalización de SAP puede ser un Fc γ R reticulado.

Pueden usarse composiciones que contienen anticuerpos anti-Fc γ RI, anticuerpos anti-Fc γ RII y/o anticuerpos anti-Fc γ RIII para suprimir trastornos de hipersensibilidad en ubicaciones inapropiadas.

En aspectos específicos, las composiciones que contienen aproximadamente 1,0 μ g/ml de anticuerpos anti-Fc γ R pueden ser eficaces para inhibir trastornos de hipersensibilidad en aproximadamente el 50%. En otros aspectos, las composiciones pueden contener una cantidad suficiente para suministrar 1,0 μ g/ml de anticuerpos anti-Fc γ R al tejido diana.

Los anticuerpos anti-Fc γ R pueden administrarse en una dosis de aproximadamente 1,0 μ g/ml, en una cantidad suficiente para suministrar 1,0 μ g/ml de anticuerpos anti-Fc γ R al tejido diana, o en una dosis suficiente para inhibir trastornos de hipersensibilidad sin producir una cantidad indeseable de muerte celular en el paciente.

(iii) Dominios Fc y anticuerpos que contienen Fc agregados

En algunos aspectos, los agonistas de señalización de SAP son IgG reticuladas o agregadas. Las IgG reticuladas o agregadas pueden incluir una IgG que puede unirse al Fc γ R diana a través de su región Fc, siempre que al menos dos tales anticuerpos IgG estén conectados físicamente entre sí.

Las IgG reticuladas o agregadas pueden incluir anticuerpos completos o una parte de los mismos, preferiblemente la parte funcional en la supresión de trastornos de hipersensibilidad. Por ejemplo, pueden incluir cualquier parte de anticuerpo que pueda reticular $Fc\gamma R$. Esto puede incluir anticuerpos agregados o reticulados o fragmentos de los mismos, tales como anticuerpos completos agregados o reticulados, fragmentos $F(ab')_2$, e incluso posibles fragmentos Fc .

La agregación o reticulación de anticuerpos puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido, tal como agregación por calor o química. Cualquier nivel de agregación o reticulación puede ser suficiente, aunque la agregación aumentada puede dar como resultado una supresión aumentada del trastorno de hipersensibilidad. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, tales como anticuerpos producidos a partir de células de hibridoma. Las composiciones y los métodos pueden emplear mezclas de anticuerpos, tales como mezclas de múltiples anticuerpos monoclonales, que pueden reticularse o agregarse a anticuerpos iguales o diferentes.

Las composiciones que contienen IgG reticuladas o agregadas pueden usarse para suprimir los trastornos de hipersensibilidad en ubicaciones inapropiadas.

Las composiciones pueden contener tan solo 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de IgG reticuladas o agregadas. Las IgG agregadas o reticuladas pueden administrarse en una cantidad suficiente para suministrar al menos 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de IgG al tejido diana, o en otra dosis suficiente para inhibir trastornos de hipersensibilidad sin producir una cantidad indeseable de muerte celular en el paciente.

(iv) Peptidomimético de SAP

Los agonistas de SAP pueden incluir peptidomiméticos. Tal como se usa en el presente documento, el término "peptidomimético" incluye péptidos modificados químicamente y moléculas de tipo péptido que contienen aminoácidos que no se producen de manera natural, peptoides, y similares. Los métodos para identificar un peptidomimético se conocen bien en la técnica e incluyen el examen de bases de datos que contienen bibliotecas de peptidomiméticos potenciales. Por ejemplo, la base de datos estructural de Cambridge contiene un conjunto de más de 300.000 compuestos que tienen estructuras cristalinas conocidas (Allen *et al.*, Acta Crystallogr. Sección B, 35:2331 (1979)). Cuando no está disponible la estructura cristalina de una molécula diana, puede generarse una estructura usando, por ejemplo, el programa CONCORD (Rusinko *et al.*, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 29:251 (1989)). Otra base de datos, el Available Chemicals Directory (directorio de productos químicos disponibles) (Molecular Design Limited, Informations Systems; San Leandro Calif.), contiene aproximadamente 100.000 compuestos que están disponibles comercialmente y también pueden buscarse para identificar peptidomiméticos potenciales de polipéptidos de SAP.

(v) Aumento de la actividad de SAP

Un agonista de SAP puede aumentar la actividad de SAP. La actividad de SAP puede aumentarse aumentando la concentración de SAP, por ejemplo, aumentando la transcripción de SAP, aumentando la traducción, aumentando la secreción de SAP, aumentando la estabilidad del ARN de SAP, aumentando la estabilidad proteica de SAP o disminuyendo la degradación proteica de SAP. La actividad de SAP también puede aumentarse aumentando específicamente la "concentración libre" de SAP, o más bien la forma no unida, por ejemplo, disminuyendo los componentes de unión endógenos de SAP.

(iv) Agentes de reticulación de $Fc\gamma R$

Pueden usarse proteínas con dominio de estructura de soporte basado en fibronectina como agonistas de SAP para reticular $Fc\gamma R$. Las proteínas con dominio de estructura de soporte basado en fibronectina pueden comprender un dominio de fibronectina de tipo III (Fn3), en particular un décimo dominio de fibronectina de tipo III ($^{10}\text{Fn3}$). Con el fin de reticular $Fc\gamma R$, pueden generarse multímeros de dominios Fn3 de unión a $Fc\gamma R$ tal como se describe en la patente estadounidense n.º 7.115.396.

Los dominios de fibronectina de tipo III (Fn3) comprenden, en orden desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, una cadena beta o similar a beta, A; un bucle, AB; una cadena beta o similar a beta, B; un bucle, BC; una cadena beta o similar a beta C; un bucle CD; una cadena beta o similar a beta D; un bucle DE; una cadena beta o similar a beta, E; un bucle, EF; una cadena beta o similar a beta F; un bucle FG; y una cadena beta o similar a beta G. Los bucles BC, DE y FG son análogos tanto estructural como funcionalmente a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las inmunoglobulinas. Los dominios Fn3 pueden estar diseñados para unirse a casi cualquier compuesto alterando la secuencia de uno o más de los bucles BC, DE y FG. Se han descrito métodos para generar aglutinantes específicos en la patente estadounidense n.º 7.115.396, que da a conocer aglutinantes de $\text{TNF}\alpha$ de alta afinidad, y en la publicación estadounidense n.º 2007/0148126, que da a conocer aglutinantes de VEGFR2 de alta afinidad. Un ejemplo de proteínas de estructura de soporte basadas en fibronectina son Adnectins™ (Adnexus, a Bristol-Myers Squibb R&D Company).

El agonista de SAP es un aptámero. Con el fin de reticular $Fc\gamma R$, pueden generarse multímeros de aptámeros de unión de $Fc\gamma R$.

Los aptámeros son oligonucleótidos, que pueden ser sintéticos o naturales, que se unen a una molécula diana particular, tal como una proteína o metabolito. Normalmente, la unión es a través de interacciones distintas al apareamiento de bases clásico de Watson-Crick. Los aptámeros representan una clase prometedora de agentes terapéuticos actualmente en desarrollo clínico y preclínico. Al igual que los productos biológicos, por ejemplo, péptidos o anticuerpos monoclonales, los aptámeros pueden unirse específicamente a dianas moleculares y, a través de la unión, inhibir la función de la diana. Un aptámero típico tiene un tamaño de 10-15 kDa (es decir, 30-45 nucleótidos), se une a su diana con afinidad sub-nanomolar, y diferencia entre dianas estrechamente relacionadas (por ejemplo, normalmente no se unirá a otras proteínas de la misma familia de genes) (Griffin, *et al.* (1993), *Gene* 137(1): 25-31; Jenison, *et al.* (1998), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8(4): 265-79; Bell, *et al.* (1999), *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 35(9): 533-42; Watson, *et al.* (2000), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10(2): 63-75; Daniels, *et al.* (2002), *Anal. Biochem.* 305(2): 214-26; Chen, *et al.* (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(16): 9226-31; Khati, *et al.* (2003), *J. Virol.* 77(23): 12692-8; Vaish, *et al.* (2003), *Biochemistry* 42(29): 8842-51).

Los aptámeros pueden crearse mediante un procedimiento de selección completamente *in vitro* (Systematic Evaluation of Ligands by Experimental Enrichment, (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) es decir, SELEX™) a partir de bibliotecas de oligonucleótidos de secuencias aleatorias tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 5.475.096 y 5.270.163. Se han generado aptámeros contra numerosas proteínas de interés terapéutico, incluyendo factores de crecimiento, enzimas, inmunoglobulinas y receptores (Ellington y Szostak (1990), *Nature* 346(6287): 818-22; Tuerk y Gold (1990), *Science* 249(4968): 505-510).

Los aptámeros tienen varias características atractivas para su uso como agentes terapéuticos. Además de la alta afinidad y especificidad por la diana, los aptámeros han mostrado poca o ninguna toxicidad o inmunogenicidad en ensayos convencionales (Wlotzka, *et al.* (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(13): 8898-902). De hecho, se han optimizado y mejorado varios aptámeros terapéuticos a través de diversas fases de desarrollo clínico, incluyendo análisis farmacocinético, caracterización de eficacia biológica en modelos de enfermedad celular y animal, y evaluación de farmacología de seguridad preliminar (Reyderman y Stavchansky (1998), *Pharmaceutical Research* 15(6): 904-10; Tucker *et al.*, (1999), *J. Chromatography B.* 732: 203-212; Watson, *et al.* (2000), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10(2): 63-75).

Un método adecuado para generar un aptámero para una diana de interés es con el procedimiento titulado "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment" ("SELEX™"). El procedimiento SELEX™ es un método para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica a moléculas diana y se describe en, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense número de serie 07/536.428, presentada el 11 de junio de 1990, ahora abandonada, la patente estadounidense n.º 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands" y la patente estadounidense n.º 5.270.163 (véase también el documento WO 91/19813) titulada "Nucleic Acid Ligands". Cada ligando de ácido nucleico identificado por SELEX™ es un ligando específico de una molécula o compuesto diana dado. El procedimiento SELEX™ se basa en la idea particular de que los ácidos nucleicos tienen capacidad suficiente para formar una variedad de estructuras bi y tridimensionales y suficiente versatilidad química disponible dentro de sus monómeros para actuar como ligandos (forman pares de unión específicos) prácticamente con cualquier compuesto químico, ya sea monomérico o polimérico. Moléculas de cualquier tamaño o composición pueden servir como dianas. El método SELEX™ aplicado a la aplicación de unión de alta afinidad implica la selección de una mezcla de oligonucleótidos candidatos e iteraciones graduales de unión, separación y amplificación, usando el mismo esquema de selección general, para lograr prácticamente cualquier criterio deseado de afinidad y selectividad de unión. Partiendo de una mezcla de ácidos nucleicos, que comprende preferiblemente un segmento de secuencia aleatorizada, el método SELEX™ incluye las etapas de poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para unir, separar ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que están unidos específicamente a moléculas diana, disociar los complejos de ácido nucleico-diana, amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-diana para dar una mezcla enriquecida en ligando de ácidos nucleicos, repetir entonces las etapas de unión, división, disociación y amplificación durante tantos ciclos como desee para dar ligandos de ácido nucleico de alta afinidad, altamente específicos, para la molécula diana. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, "SELEX™," es un método para obtener un ligando de ácido nucleico para cualquier diana deseada, tal como se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.475.096 y 5.270.163, y en el documento PCT/US91/04078.

En algunas realizaciones, los agonistas de SAP son Nanobodies®. Los Nanobodies® son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural. La tecnología de Nanobody® se desarrolló originalmente tras el descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). Y lo que es más importante, el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido estable que alberga la capacidad de unión de antígeno completo del anticuerpo original de cadena pesada. Estos dominios VHH recientes con propiedades estructurales y funcionales únicas constituye la base de una nueva generación de anticuerpos terapéuticos.

Agonistas del factor de pro-hipersensibilidad

- La terapia anti-hipersensibilidad engloba agentes que inhiben o antagonizan con factores de pro-hipersensibilidad, tales como agentes que reconocen uno o más factores de crecimiento o citocinas implicadas en la formación y el mantenimiento de una respuesta de hipersensibilidad. De este modo, la terapia anti-hipersensibilidad puede usarse para antagonizar con las actividades de células implicadas en respuestas de hipersensibilidad incluyendo células Th2 T, mastocitos, basófilos, células B (plasma), eosinófilos, macrófagos, células dendríticas.
- Los factores de pro-hipersensibilidad que pueden ser dianas con antagonistas como parte de las terapias descritas en el presente documento incluyen, sin limitación, IL-4, IL-13, IL-5, IL-9, IL-15, IL-17A, IL-17E, IL-33, IL-21, TSLP, IgE, histamina, prostaglandinas alérgicas y cisteinil-leucotrienos y otros factores que se sabe que promueven o están relacionados con el mantenimiento de trastornos de hipersensibilidad.
- La terapia anti-hipersensibilidad puede incluir anticuerpos dirigidos contra uno o más de los factores de pro-hipersensibilidad. Tales anticuerpos pueden estar purificados, no purificados o parcialmente purificados. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales, derivados de cualquier fuente animal adecuada, tal como ratón, conejo, rata, ser humano, caballo, cabra, ganado bovino, y similares. Tales anticuerpos pueden incluir fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de cadena individual, anticuerpos polimerizados y/o fragmentos de anticuerpo y similares.
- La terapia anti-hipersensibilidad puede incluir antagonistas del receptor correspondiente de uno o más de los factores de pro-hipersensibilidad y/o citocinas, tales como fragmentos de los mismos. Tales formas en concentración adecuada pueden competir con sus factores de pro-hipersensibilidad correspondientes y/o citocinas para unirse a su receptor. De manera similar, pueden usarse determinados anticuerpos frente al receptor para interferir con o impedir la unión al mismo de los correspondientes factores de pro-hipersensibilidad y/o citocinas.
- La terapia anti-hipersensibilidad puede incluir formas solubles del receptor de uno o más de los factores de pro-hipersensibilidad y/o citocinas, de manera que el receptor soluble compite con su receptor celular nativo correspondiente por ese ligando.
- La terapia anti-hipersensibilidad puede incluir compuestos que compiten con o que interfieren de otro modo con la unión de uno o más de los factores de pro-hipersensibilidad y/o citocinas con su receptor.
- La terapia anti-hipersensibilidad puede incluir uno o más oligorribonucleótidos que contienen al menos una secuencia que es antisentido con respecto a uno o más de los factores de pro-hipersensibilidad y/o citocinas. Tales componentes pueden incluir también uno o más plásmidos de expresión que tienen secuencias de control de la transcripción adecuadas que producen secuencias antisentido. La terapia anti-hipersensibilidad puede incluir uno o más oligorribonucleótidos bicatenarios, o plásmidos de expresión que codifican para los mismos, que son adecuados para degradar transcritos de uno o más de los factores de pro-hipersensibilidad y/o citocinas a través de interferencia mediada por ARN. La terapia anti-hipersensibilidad puede incluir uno o más aptámeros de oligonucleótidos monocatenarios, o plásmidos de expresión que codifican para los mismos, que son adecuados para inhibir la unión de los factores de pro-hipersensibilidad a sus receptores relacionados.
- Un antagonista de factor de pro-hipersensibilidad adecuado factor puede incluir componentes que se sabe que inhiben, atenúan o interfieren con uno o más componentes de las rutas de señalización intracelulares activadas por uno o más de los factores de pro-hipersensibilidad tras la unión a su receptor correspondiente. Por ejemplo, el factor de transcripción STAT6 en células T CD4+ sin tratar se activa por IL-4 y estimula el desarrollo de Th2. De manera similar, GATA-3, otro factor de transcripción, se produce en respuesta al reconocimiento de antígenos y se potencia por IL-4 para amplificar los mecanismos de respuestas de Th2. Ambos reguladores de la transcripción son importantes para el desarrollo de las células Th2 y por tanto son responsables de promover respuestas de hipersensibilidad.
- Un agonista de factor de anti-hipersensibilidad adecuado puede incluir inhibidores de histamina, prostaglandinas y precursores de cisteinil-leucotrieno.
- 45 *Corticosteroides*
- La inflamación mediada por células Th2, particularmente en vías respiratorias con asma alérgica, se suprime por corticosteroides a través de la inhibición de la expresión de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, cuyos genes codificantes están regulados por factores de transcripción tales como el factor nuclear κ B (NF- κ B) y la proteína de activación 1 (AP1).
- 50 *Agonistas del receptor adrenérgico β 2*
- Los agonistas del receptor adrenérgico β 2 de acción prolongada o de corta duración (SABA y LABA) son uno de los tratamientos más eficaces para el alivio rápido de las respuestas alérgicas. En particular, los SABA inhalados, como salbutamol y terbutalina, son los broncodilatadores más eficaces disponibles actualmente para el alivio rápido de los síntomas del asma alérgica. Tras la unión de estos agonistas al receptor adrenérgico β 2, se estimula la adenilato ciclasa mediante la transducción de señales de proteínas G para aumentar la producción de adenosina 3'5'-monofosfato cíclica (AMPC), activando de ese modo la proteína cinasa A. Esto media la relajación del músculo liso a

través de la fosforilación de la cinasa de cadena ligera de miosina abriendo los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (KCa), que alivia la broncoconstricción en el asma alérgica. Dos LABA inhalados, formoterol y salmeterol, inducen broncodilatación durante al menos 12 horas y se usan como terapia complementaria para el asma alérgica que no se controla mediante corticosteroides inhalados. Los LABA pueden aumentar la eficacia de los corticosteroides inhalados.

Cromoglicato

El cromoglicato (también denominado cromolina) se describe tradicionalmente como un estabilizador de mastocitos, y se comercializa comúnmente como la sal sódica, cromoglicato de sodio o cromolina sódica. Este fármaco impide la liberación de productos químicos inflamatorios tales como histamina de los mastocitos. Está disponible como un pulverizador nasal (Rynacrom, Nasalcrom, Prevalin) para tratar la rinitis alérgica, como un inhalador (Intal) para el tratamiento preventivo del asma alérgica, como colirios (Opticrom y Optrex Allergy, Crolom) para la conjuntivitis alérgica; o en forma oral (Gastrocrom) para tratar mastocitosis, urticaria dermatográfica y colitis ulcerosa. También se ha mostrado que el cromoglicato de sodio reduce los síntomas de alergias a alimentos.

Xantinas

La xantina es una base de purina encontrada en la mayoría de tejidos y fluidos corporales. Los derivados de xantina, conocidos colectivamente como xantinas, son un grupo de alcaloides usados comúnmente por sus efectos como broncodilatadores y estimulantes suaves, notablemente en el tratamiento los síntomas de asma alérgica. Debido a efectos secundarios sistémicos, no deseados, el intervalo terapéutico de las xantinas es estrecho, haciendo de ellas un tratamiento contra el asma alérgica de segunda línea. El nivel terapéutico es de 10-20 $\mu\text{g/ml}$ en sangre.

Inhibidores y antagonistas efectores

Los antihistamínicos H1, tales como clorfenitamina, se usaron por primera vez como agentes específicos para tratar reacciones alérgicas. Una segunda generación de fármacos incluye cetirizina, levocetirizina, loratadina y desloratadina.

Los CysLT son los agonistas contráctiles más potentes del músculo liso de las vías respiratorias y también tienen efectos sobre microvasos, glándulas mucosas, eosinófilos y nervios interaccionando con el receptor 1 de CysLT (CysLTR1) durante el asma alérgica activa y la rinitis; se han detectado niveles aumentados de CysLTC4, CysLTD4 y CysLTE4 en fluidos biológicos. Ni la biosíntesis ni las acciones de CysLT se inhiben por los corticosteroides. Los modificadores de leucotrienos orales disponibles actualmente son antagonistas de CysLTR1 (montelukast, zafirlukast y pranlukast). Los inhibidores de leucotrienos también son eficaces para el tratamiento de la rinoconjuntivitis alérgica, pero no para el tratamiento de la dermatitis atópica.

La teofilina es una xantina con actividad tanto como inhibidor de la AMPc fosfodiesterasa como antagonista del receptor de adenosina. La teofilina se ha usado para tratar la broncoconstricción por asma alérgica. Anteriormente, la inhibición de fosfodiesterasa más eficaz se lograba seleccionando como diana la isoenzima de tipo 4 con fármacos distintos de xantina tales como rofumulast. Otros antagonistas incluyen inhibidores de PDE4 y MAP cinasa p38.

Tratamiento de enfermedad resistente

Hay algunos pacientes con trastornos de hipersensibilidad, particularmente asma alérgica, cuyos síntomas no se controlan de manera adecuada mediante los tratamientos convencionales. Los inhibidores de calcineurina tales como la ciclosporina A oral y el tacrolimús y el pimecrolimús aplicados localmente, son tratamientos eficaces para la dermatitis atópica que es resistente al tratamiento con corticosteroides. El fracaso de los corticosteroides a la hora de disminuir el nivel de expresión de TNF y otras citocinas asociadas con células Th2 en las vías respiratorias con asma alérgica podría explicar por qué los corticosteroides tienen efectos limitados en formas más graves de la enfermedad. Basándose en la expresión aumentada de TNF en las vías respiratorias y en células mononucleares de la sangre en el asma alérgica grave, los pacientes pueden tratarse con proteínas de fusión de TNF soluble-receptor y anticuerpos monoclonales específicos frente a TNF. Los inhibidores de la proteína cinasa activada por mitógeno p38 y la I κ B cinasa, tal como SB 220025 y TPCA-1, son nuevos enfoques terapéuticos para el asma alérgica resistente. Estos fármacos inhiben la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como TNF e IL-1.

Inmunoterapia específica de alérgenos

La inmunoterapia específica de alérgenos (SIT) es una terapia de modificación del sistema inmunitario que se ha recomendado para el tratamiento de la rinitis alérgica, la hipersensibilidad venosa, algunas alergias a fármacos y el asma alérgica bronquial leve. La SIT induce tolerancia inmunológica y la inducción de anticuerpos frente a IgG4 bloqueantes a través de la repetición repetida a alérgenos. Tras la exposición experimental o natural a alérgenos, la SIT disminuye el reclutamiento de mastocitos, basófilos y eosinófilos en la piel, nariz, ojos y mucosa bronquial. La SIT produce un aumento en el nivel de anticuerpos IgA e IgG4 específicos de alérgenos, y una disminución en el nivel de anticuerpos IgE específicos de alérgenos. También induce que las células T_{Reg} CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ produzcan altos niveles de IL-10 y/o TGF β , dos citocinas que se sabe que atenúan las respuestas de células Th2

específicas de alérgenos. IL-10 suprime respuestas de mastocitos, eosinófilos y células T, y las funciones pleiotrópicas de TGF β mantienen un repertorio de células T diversos y autotolerante incluyendo las células T_{Reg}. La inmunoterapia subcutánea (SCIT) implica la inyección subcutánea regular de extractos de alérgenos o alérgenos recombinantes usando regímenes incrementales, llevando la inducción de tolerancia desde varios días hasta varios meses dependiendo del régimen usado. Una vez que se induce tolerancia, puede durar varios días sin tratamiento adicional. La unión de motivos de oligonucleótidos CpG a alérgenos purificados es un enfoque prometedor para SCIT aumentando la eficacia y la disminución de los efectos secundarios. La administración de alérgenos a la mucosa oral como vía para inmunoterapia ha adquirido mayor aceptación recientemente (SLIT). SCIT y SLIT también disminuyen el desarrollo de sensibilización a nuevos alérgenos y disminuye el riesgo de nueva asma alérgica tanto en adultos como en niños con rinitis.

Antagonismo de IgE

El papel de vigilancia de IgE es aumentar la captación de alérgenos por DC y la activación de mastocitos y basófilos para la liberación de mediadores. Se sabe que los anticuerpos IgG específicos para el dominio C3 de IgE que bloquean la unión de IgE a Fc ϵ RI y Fc ϵ RII bloquean las respuestas inflamatorias inducidas por alérgenos. Se ha desarrollado Omalizumab, una IgG1 no anafiláctica, específica de IgE humanizada, para el tratamiento del asma alérgica grave. Omalizumab también es eficaz para el tratamiento de la rinoconjuntivitis alérgica. Lumiliximab, un anticuerpo específico para el receptor de IgE de baja afinidad Fc ϵ RII, también disminuye los niveles circulantes de IgE y ha pasado ensayos de fase I para el asma alérgica de leve a moderada.

Inhibidores de mastocitos

El fármaco de estabilización de mastocitos, cromoglicato de sodio (SCG) y el nedocromil sódico se introdujeron por primera vez como tratamientos para el asma alérgica. Tras la inhalación, ambos fármacos inhiben las respuestas de fase temprana y tardía inducidas por alérgenos en las vías respiratorias altas y bajas y en la conjuntiva, donde los mastocitos de la mucosa están implicados de manera crucial en la respuesta alérgica. El nedocromil sódico y el SCG inhiben el flujo de iones cloruro en mastocitos, células epiteliales y neuronas para aumentar su umbral para activación. Los mastocitos también expresan un canal de K⁺ activado por Ca²⁺, K(CA)3.1, que promueve la quimiotaxis de mastocitos y aumenta la activación de mastocitos dependiente de IgE, lo que indica que la inhibición de K(Ca)3,1 con fármacos tales como clotriazol y TRAM-34 promovería la inhibición de mastocitos.

Las SRC tirosina cinasas FYN y LYN son moduladores importantes de los acontecimientos moleculares que se inician por el acoplamiento de Fc ϵ RI. A su vez fosforilan la cadena de señalización g asociada con Fc ϵ RI que recluta la SYK tirosina cinasa. Entonces se activa SYK a través de fosforilación mediante FYN y LYN. Varios métodos de tratamiento se dirigen a inactivar SYK y bloquear de ese modo la propagación de señalización de Fc ϵ RI. Se ha identificado R122 (2,4-diaminopirimidina) como un inhibidor reversible de SYK en mastocitos. En la rinitis alérgica, la administración intranasal de R112 inhibe la obstrucción nasal, la rinorrea y la inhibición de producción de prostaglandina D2. En pacientes con rinitis estacional, R122 es eficaz en la reducción de los síntomas globales de la rinitis con aparición rápida.

La interacción del factor de células madre (SCF) con su receptor de tirosina cinasa (KIT) es obligatoria para el desarrollo, proliferación, supervivencia, migración y adhesión de mastocitos, y para la producción de citocinas y la desgranulación de mastocitos inducidas por IgE óptimas. Los candidatos de fármaco que seleccionan como diana SCF o KIT incluyen anticuerpos específicos frente a SC, oligonucleótidos antisentido, inhibidores de KIT e inhibidores de moléculas de señalización posteriores. El mesilato de Imatinib, nilotinib y desatinib son tirosina cinasas que pueden inducir apoptosis de mastocitos.

La modulación de la expresión de receptores de activación e inhibición es un mecanismo importante para regular respuestas inmunitarias. Las células que se activan a través de la unión de receptores que portan motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM) pueden regularse negativamente por otros receptores que portan motivos de inhibición de inmunorreceptores basados en tirosina (ITIM). Los animales deficientes en Fc γ RIIB, gp49B1, o receptor B similar a inmunoglobulina de pared han aumentado las respuestas alérgicas. IgG puede suprimir completamente la anafilaxia mediada por IgE interaccionando con Fc γ RIIB, lo que conduce a la activación de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP) que contiene el dominio de homología 2 a SRC (SH2) a través del reclutamiento de DOK y RasGAP por Fc ϵ RI. Se recurre a mecanismos inhibidores similares cuando se activa ngp49B1 en mastocitos por su ligando de integrina α v β 3. Los receptores de tipo inmunoglobulina y sus moléculas de señalización intracelular proporcionan dianas terapéuticas importantes para inhibir los mastocitos, así como células T, implicadas en la cascada alérgica. Una proteína de fusión Fc γ -Fc ϵ bifuncional humana diseñada para reticularse a Fc γ RIIB y Fc ϵ RI en mastocitos y basófilos humanos inhibe las reacciones alérgicas y la desgranulación dependientes de IgE.

Inmunoterapias con citocinas

Puesto que las citocinas de Th2 desempeñan un papel principal en orquestar la inflamación alérgica, ellas y sus receptores son dianas terapéuticas clave. Este enfoque ha requerido la aplicación de agentes biológicos en forma de anticuerpos monoclonales bloqueantes, proteínas de función y inhibidores de los factores de transcripción de Th2,

STAT-6 y GATA-3.

A.) *IL-4*

Tanto IL-4 como IL-13 desempeñan un papel crucial en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas de células B para producir IgE, mientras que IL-4 solo es responsable de mantener el fenotipo de las células Th2, lo que hace que ambas citocinas sean dianas terapéuticas atractivas. Muchos estudios han mostrado que bloquear la producción de IL-4 tiene efectos profundos sobre el fenotipo alérgico. Un receptor de IL-4 soluble, recombinante, humano (altrakinecept) consiste en la parte extracelular de IL-4R α humano y no es inmunogénico. Se ha usado para tratar el asma alérgica de leve a moderada y se indicó su eficacia permitiendo la retirada del tratamiento con corticosteroides inhalados sin recaída. Están en curso otros estudios usando anticuerpos bloqueantes humanizados frente a IL-4R α y específicos frente a IL-4 tales como pascolizumab. Además, se han sometido a prueba dos vacunas frente a IL-4 y ambas indujeron altos títulos de anticuerpos específicos para IL-4 e inhibieron la inflamación pulmonar inducida por antígenos.

B.) *IL-13*

Las numerosas funciones de IL-13 en la regulación de la producción de IgE, la inflamación eosinofílica, la hiperplasia del músculo liso de las vías respiratorias, la inducción de hiperplasia de células caliciformes con producción de moco y el reclutamiento de monocitos, macrófagos y células T en espacios de las vías respiratorias hace de ella una diana terapéutica clave en la alergia y el asma alérgica. IL-13 se une a una subunidad IL-13R α 1 de baja afinidad y a un complejo de alta afinidad comprendido por IL-13R α 1 e IL-4R α . La unión a este complejo de alta afinidad conduce a la activación dependiente de fosforilación de la Janus cinasa 1 (JAK1), JAK2 y STAT-6. IL-4R α también estabiliza la unión de IL-13 a su receptor para aumentar respuestas mediadas por IL-13. Sin embargo, una cadena de unión a IL-13 de alta afinidad, no de señalización, IL-13R α 2, inhibe fuertemente la actividad de IL-13. El bloqueo selectivo de IL-13 se ha logrado usando una forma soluble de IL-13R α 2, que compite por unirse a IL-13 pero no a IL-4, y esto condujo a la inversión de la hiperreactividad de las vías respiratorias y la producción de moco en animales sensibilizados expuestos a alérgenos.

También podría lograrse el antagonismo de los efectos de IL-13 mediante la administración de receptores solubles de IL-13 de anticuerpos monoclonales específicos de IL-13R. Se han usado ensayos de fase I del anticuerpo monoclonal específico frente a IL-13, CAT-354, para tratar satisfactoriamente pacientes con asma alérgica leve. La pitrakina por vía subcutánea o inhalada, una proteína IL-4 mutante que inhibe la unión de IL-4 e IL-13 a complejos de IL-4R α , tiene eficacia demostrada en el tratamiento del asma alérgica inducida por alérgenos. Una vacuna basada en el péptido IL-13 recombinante novedosa también ha demostrado que reduce respuestas inflamatorias alérgicas. Puesto que STAT-6 es el factor de transcripción común para la señalización tanto de IL-4 como de IL-13, también es una diana terapéutica atractiva usando un péptido dominante negativo. Podrían usarse estrategias terapéuticas basadas en interferencia de ARN y antisentido para seleccionar como diana diversas moléculas de señalización anteriores en el asma alérgica y la alergia, incluyendo Fc ϵ RI α , receptores de citocinas, moléculas de adhesión, canales de iones, citocina y factores relacionados, moléculas de transducción de señales intracelulares y factores de transcripción implicados en la diferenciación de células Th2 y en la inflamación alérgica.

C.) *IL-5*

Estudios con roedores y primates no humanos indicaron un papel importante para IL-5 en diversos modelos de asma alérgica. IL-5 inhalada modula el número de progenitores de eosinófilos tanto en las vías respiratorias como en la médula ósea de individuos con asma alérgica e induce eosinofilia local en individuos no asmáticos. Se han desarrollado dos anticuerpos monoclonales humanizados, específicos de IL-5, Sch-55.700 y mepolizumab, para el tratamiento del asma alérgica. Mepolizumab produce una rápida reducción dependiente de la dosis en el número de eosinófilos circulantes y en el esputo. Los pacientes con asma alérgica grave y persistente tratados con Sch-55.700 muestran una disminución en el número de eosinófilos de la sangre.

D.) *IL-9*

El bloqueo de las acciones de IL-9 reduce la inflamación inducida por alérgenos de las vías respiratorias y la hiperreactividad de las vías respiratorias. Están usándose anticuerpos monoclonales específicos para IL-9 para tratar pacientes con asma alérgica persistente, de moderada a grave.

E.) *IL-12*

IL-12 envía una fuerte señal a células T precursoras sin tratar, dirigiendo su diferenciación hacia células Th1 y cambiando la respuesta inmunitaria hacia inmunidad mediada por células. La administración de IL-12 durante la sensibilización suprime las respuestas de células Th2 inducidas por alérgenos en el factor de desarrollo de células Th1 e inhibe la hiperreactividad de las vías respiratorias y la eosinofilia de las vías respiratorias tras la exposición a antígenos. La inyección de IL-12 recombinante en pacientes con asma alérgica leve disminuyó el número de eosinófilos en sangre circulante tras la exposición a alérgenos.

F.) IL-10

IL-10 inhibe la expresión de muchas citocinas y quimiocinas proinflamatorias, así como las enzimas proinflamatorias, y es la principal citocina inhibidora producida por células T_{Reg} en inmunoterapia con alérgenos. La administración de IL-10 disminuye los números de células T CD4+ y CD8+ circulantes, con supresión de proliferación de células T inducida por mitógenos y producción de IL-1 β y TNF inducida por endotoxinas.

G.) Interferones

De las citocinas asociadas a células Th1, IFN γ es la más potente en suprimir inflamación alérgica mediada por células Th2, y la administración exógena de IFN γ suprime la inflamación alérgica de las vías respiratorias en modelos animales. IFN γ también se induce fuertemente durante la inmunoterapia específica de alérgeno. La administración sistémica de IFN γ es eficaz para el tratamiento de asma alérgica grave que no responde a corticosteroides.

Preparaciones y formulaciones farmacéuticas

La presente memoria descriptiva proporciona una composición farmacéutica que comprende una población de células T reguladoras en una formulación que es adecuada para su administración a un paciente que necesita las mismas. La población de células T para su uso en la composición puede generarse mediante los métodos descritos en el presente documento. Al menos el 70, el 80, el 90 o el 100% de las células de la composición pueden ser células T reguladoras.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una población de células T reguladoras enriquecida en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; hidratos de carbono tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos; manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA; adyuvantes y conservantes. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para tratar o prevenir un trastorno de hipersensibilidad en un sujeto humano.

La composición descrita en el presente documento puede contener una cantidad terapéuticamente eficaz de células T reguladoras en combinación con una cantidad eficaz de uno o más agentes activos. En determinados aspectos, el agente activo comprende al menos una citocina (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β y/o IL-15). En determinados aspectos, el agente activo es uno o más agonistas de SAP. El agente activo adicional puede ser un agente terapéutico usado para tratar trastornos o estados de hipersensibilidad.

La composición farmacéutica que comprende células T reguladoras se administra a un sujeto que necesita la misma de una manera apropiada para la enfermedad que va a tratarse y/o prevenirse. La dosificación y la frecuencia de administración se determinarán por factores tales como el estado del paciente y el tipo y/o la gravedad de la enfermedad del paciente. Las dosificaciones apropiadas también pueden determinarse mediante ensayos clínicos. Una "cantidad eficaz" de la composición puede determinarse por un médico considerando las diferencias individuales en edad, peso, gravedad de la enfermedad, estado del paciente, vía de administración y cualquier otro factor relevante para el tratamiento del paciente. En general, una composición farmacéutica que comprende células T reguladoras puede administrarse a una dosificación de aproximadamente 10⁴ a 10⁹ células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores de números enteros dentro de estos intervalos. Las composiciones también pueden administrarse múltiples veces a estas dosificaciones. La dosificación y el régimen de tratamiento óptimos para un paciente particular pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica de la medicina monitorizando al paciente para determinar signos de enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

Las células pueden administrarse usando técnicas de infusión que se usan comúnmente en inmunoterapia, y pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía intramuscular o mediante inyección intravenosa (véase, por ejemplo, Rosenberg *et al.*, New Eng. J. Med.). Las composiciones descritas en el presente documento se formulan preferiblemente para administración intravenosa.

Los métodos descritos en el presente documento pueden implicar la administración de una terapia anti-hipersensibilidad a un sujeto. Los agentes terapéuticos pueden formularse de manera convencional usando uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, los agentes terapéuticos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para su administración mediante, por ejemplo, inyección (por ejemplo s.c., i.m., i.p.), inhalación o insuflación (o bien a través de la boca o bien de la nariz) o mediante administración oral, bucal, sublingual, transdérmica, nasal, parenteral o rectal. Los agentes terapéuticos pueden administrarse localmente, en el sitio en que están presentes las células diana, es decir, en un tejido, órgano, o fluido específico (por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo, masa tumoral, etc.).

Los agentes terapéuticos pueden formularse para una variedad de modos de administración, incluyendo administración sistémica y tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones pueden encontrarse generalmente en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. Para la administración parenteral, se

5 prefiere la inyección, incluyendo intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para la inyección, los compuestos pueden formularse en disoluciones líquidas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank o solución de Ringer. Además, los compuestos pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se incluyen formas liofilizadas. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos pueden administrarse a las células mediante una variedad de métodos conocidos por los familiarizados con la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis, o mediante su incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas.

10 Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas para chupar o cápsulas preparadas mediante medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Las preparaciones líquidas pueden prepararse mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tampón, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse de manera adecuada para proporcionar liberación controlada al compuesto activo.

25 Para la administración mediante inhalación (por ejemplo, administración pulmonar), los agentes terapéuticos pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación en aerosol/pulverizador a partir de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de por ejemplo, gelatina, para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

35 En los métodos descritos en el presente documento, los compuestos farmacéuticos también pueden administrarse mediante vías intranasal o intrabronquial incluyendo insuflación, polvos y formulaciones en aerosol (por ejemplo de medicamentos inhalados de esteroides, véase Rohatagi (1995) *J. Clin. Pharmacol.* 35:1187-1193; Tjwa (1995) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 75:107-111). Por ejemplo, las formulaciones en aerosol pueden colocarse en propelentes aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. También pueden formularse como productos farmacéuticos para preparaciones no presurizadas tal como en un nebulizador o un atomizador. Normalmente, una administración de este tipo es en un tampón acuoso farmacológicamente aceptable.

40 Los agentes terapéuticos pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de su uso.

50 Además, los agentes terapéuticos también pueden formularse como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo por vía subcutánea o por vía intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los agentes terapéuticos pueden formularse con materiales hidrófobos o poliméricos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble. La fórmula de liberación controlada también incluye parches.

55 Los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse para su administración al sistema nervioso central (SNC) revisado en Begley, *Pharmacology & Therapeutics* 104: 29-45 (2004)). Los enfoques convencionales para la administración de fármacos al SNC incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ejemplo, producción de una proteína de fusión química que comprende un péptido de transporte que tiene afinidad por una molécula de la superficie de las células endoteliales en combinación con un agente que por sí mismo no puede atravesar la BHE) en un intento por aprovecharse de una de las rutas de transporte endógenas de la BHE; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad lipídica de un agente (por ejemplo, conjugación de agentes solubles en agua con portadores de lípidos o colesterol); y la alteración transitoria de la integridad de la BHE por alteración

hiperosmótica (que resulta de la infusión de una disolución de manitol en la arteria carótida o del uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina).

Los agentes terapéuticos pueden incorporarse en una formulación tópica que contiene un portador tópico que generalmente es adecuado para la administración tópica de fármacos y que comprende cualquier material de este tipo conocido en la técnica. El portador tópico puede seleccionarse para proporcionar la composición en la forma deseada, por ejemplo, como una pomada, loción, crema, microemulsión, gel, aceite, disolución, o similar, y puede estar comprendido por un material o bien que se produce de manera natural o bien de origen sintético. Es preferible que el portador seleccionado no afecte adversamente al agente activo ni a otros componentes de la formulación tópica. Los ejemplos de portadores tópicos adecuados para su uso en el presente documento incluyen agua, alcoholes y otros disolventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite mineral, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras y similares.

Las composiciones farmacéuticas (incluyendo las preparaciones cosméticas) pueden comprender desde aproximadamente el 0,00001 hasta el 100% tal como desde el 0,001 hasta el 10% o desde el 0,1% hasta el 5% en peso de uno o más agentes terapéuticos descritos en el presente documento. En determinadas formulaciones tópicas, el agente activo está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente el 0,25% en peso al 75% en peso de la formulación, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 0,25% en peso al 30% en peso de la formulación, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 0,5% en peso al 15% en peso de la formulación, y lo más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 1,0% en peso al 10% en peso de la formulación.

Los estados oculares pueden tratarse o prevenirse, por ejemplo, mediante inyección sistémica, tópica, intraocular de agentes terapéuticos, o mediante la inserción de un dispositivo de liberación sostenida que libera agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos pueden administrarse en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de manera que el compuesto se mantiene en contacto con la superficie ocular durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre en las regiones corneal e interna del ojo, como por ejemplo la cámara anterior, conjuntiva, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/cuerpo ciliar, cristalino, coroides/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, una pomada, aceite vegetal o un material de encapsulación. Alternativamente, los compuestos pueden inyectarse directamente en el humor vítreo o acuoso. En una alternativa adicional, los compuestos pueden administrarse por vía sistémica, tal como por inyección o infusión intravenosa, para el tratamiento del ojo.

Los agentes terapéuticos descritos en el presente documento pueden almacenarse en un entorno libre de oxígeno según métodos en la técnica.

Se conocen en la técnica métodos para administrar compuestos de ácido nucleico (véase, por ejemplo, Akhtar *et al.*, 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; y Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Sullivan *et al.*, publicación PCT n.º WO 94/02595). Estos protocolos pueden utilizarse para la administración de prácticamente cualquier compuesto de ácido nucleico. Los compuestos de ácido nucleico pueden administrarse a las células mediante una variedad de métodos conocidos por los familiarizados en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis, o mediante su incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas. Alternativamente, la combinación de ácido nucleico/vehículo se administra localmente mediante inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. Otras vías de administración incluyen, pero sin limitarse a, administración oral (forma de comprimido o píldora) e/o intratecal (Gold, 1997, Neuroscience, 76, 1153-1158). Otros enfoques incluyen el uso de diversos sistemas de transporte y portadores, por ejemplo a través del uso de conjugados y polímeros biodegradables. Para una revisión completa sobre estrategias de administración de fármacos, véase Ho *et al.*, 1999, Curr. Opin. Mol. Ther., 1, 336-343 y Jain, Drug Delivery Sistemas: Technologies and Commercial Opportunities, Decision Resources, 1998 y Groothuis *et al.*, 1997, J. NeuroVirol., 3, 387-400. Descripciones más detalladas de suministro y administración de ácido nucleico se proporcionan en Sullivan *et al.*, citado anteriormente, Draper *et al.*, documento PCT WO93/23569, Beigelman *et al.*, publicación PCT n.º WO99/05094, y Klimuk *et al.*, Publicación PCT n.º WO99/04819.

Pueden administrarse nucleótidos antisentido, tales como ARNip a células de cáncer usando una variedad de métodos. Pueden usarse péptidos de penetración celular (CPP) que tienen la capacidad de transportar moléculas de "carga" unidas en el citosol (véase Juliano, Ann N Y Acad Sci. Oct de 2006; 1082:18-26). Puede usarse un sistema de administración de oligonucleótidos mediado por atelocolágeno (Hanai *et al.* Ann N Y Acad Sci. Oct de 2006;1082:9-17). Puede usarse una formulación de LPD (complejo de liposoma-policonjugación-ADN) para administrar ARNip a células tumorales. (Li *et al.* Ann N Y Acad Sci. Oct de 2006;1082:1-8). También puede usarse complejación de ARNip con la polietilimimina (PEI) para administrar ARNip a las células (Aigner, J Biomed Biotechnol. 2006;2006(4):71659). El ARNip también puede complejarse con nanopartículas de poliisohexilcianoacrilato (PIHCA) recubiertas con quitosano para la administración *in vivo*. (Pille *et al.*, Hum Gene Ther. Oct de 2006;17(10):1019.

La presente memoria descriptiva proporciona además el uso de cualquier agente identificado por la presente memoria descriptiva en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno o estado de hipersensibilidad en un paciente, por ejemplo, el uso de un agonista de SAP en la fabricación de un

medicamento para el tratamiento de un trastorno o estado de hipersensibilidad. En algunos aspectos, puede usarse cualquier agente identificado por la presente memoria descriptiva para obtener una preparación farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o estado de hipersensibilidad.

- 5 Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la manera de uso de la invención descrita anteriormente, así como para explicar los mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos no sirven en modo alguno para limitar el verdadero alcance de esta invención, sino que más bien se presentan para fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1.

- 10 La enfermedad alérgica crónica de las vías respiratorias inducida por conidios de *A. fumigatus* se caracteriza por hiperreactividad de las vías respiratorias, inflamación pulmonar, eosinofilia, hipersecreción de moco, hiperplasia de células calciformes y fibrosis subepitelial. Se sensibilizaron ratones C57BL/6 de manera similar a una preparación disponible comercialmente de antígenos solubles de *A. fumigatus* tal como se describió anteriormente (Hogaboam *et al.* The American Journal of Pathology. 2000; 156: 723-732). Siete días tras la tercera exposición intranasal, cada
15 ratón recibió $5,0 \times 10^6$ conidios de *A. fumigatus* suspendidos en 30 μ l de PBS Tween 80 (el 0,1%, vol/vol) a través de la vía intratraqueal.

- En los puntos de tiempo de los días 15 y 30 (figuras 2A y 2B, respectivamente), se analizaron grupos de cinco ratones tratados con SAP o control (PBS) para determinar cambios en la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR). Se evaluó la hiperreactividad bronquial tras una exposición intratraqueal a conidios de *A. fumigatus* usando
20 un pletismógrafo Buxco™ (Buxco, Troy, NY). Brevemente, se usó pentobarbital sódico (Butler Co., Columbus, OH; 0,04 mg/g de peso corporal de ratón) para anestesiarse a los ratones antes de su intubación y se llevó a cabo la ventilación con un respirador de bomba Harvard (Harvard Apparatus, Reno NV). Una vez establecida la resistencia de las vías respiratorias de nivel inicial, se introdujeron 420 mg/kg de metacolina en cada ratón a través de la vena de la cola canulada, y se monitorizó la hiperreactividad de las vías respiratorias durante aproximadamente
25 3 minutos. Se registró el aumento máximo en la resistencia de las vías respiratorias. En los puntos de tiempo de los días 15 y 30 (figuras 2A y 2B, respectivamente), se anestesió a grupos de cinco ratones tratados con SAP o control (PBS) con pentobarbital sódico y se analizaron para determinar cambios en la hiperreactividad de las vías respiratorias. SAP redujo significativamente la cantidad de AHR en respuesta a exposición a metacolina intravenosa.

Ejemplo 2.

- 30 Se sensibilizaron de manera similar ratones C57BL/6 a una preparación disponible comercialmente de antígenos solubles de *A. fumigatus* tal como se describió anteriormente. Los animales se trataron *in vivo* con hSAP o control con PBS durante las últimas dos semanas del modelo. En los puntos de tiempo de los días 15 y 30 (figuras 3A y 3B, respectivamente), se analizaron grupos de cinco ratones tratados para determinar los cambios en la producción de citocina. Se aislaron células de bazo de animales a los 15 ó 30 días tras la exposición intratraqueal a
35 conidios, se estimularon con antígeno de *Aspergillus* y se trataron *in vitro* con hSAP. Se cuantificaron los cultivos de esplenocitos (pg/ml) para determinar la producción de IL-4, IL-5, e IL-10.

Ejemplo 3.

- Se sensibilizaron de manera similar ratones C57BL/6 a una preparación disponible comercialmente de antígenos solubles de *A. fumigatus* tal como se describió anteriormente. En el día 15, se determinó la cantidad de expresión de
40 FoxP3 en ganglios linfáticos de drenaje pulmonar o cultivos de esplenocitos. Se diseccionaron los ganglios linfáticos pulmonares de cada ratón y se congelaron instantáneamente en N₂ líquido o se fijaron en formalina al 10% para el análisis histológico. Se tiñeron las muestras histológicas de los animales tratados con PBS (control) o SAP para determinar FoxP3 (figura 4A), y se cuantificó el número de células FoxP3+ en relación con cada campo examinado (figura 4B). Se estimularon los cultivos de esplenocitos purificados con antígeno de *Aspergillus in vitro* en presencia
45 o ausencia de SAP *in vitro* (0,1-10 μ g/ml) durante 24 horas. Se cuantificó la expresión de FoxP3 total usando RT-PCR en tiempo real (figura 4C).

Ejemplo 4.

- Se examinaron los efectos de SAP *in vivo* e *in vitro* sobre IL-10 y recuerdo de antígeno. Los ratones se sensibilizaron y se expusieron a *Aspergillus fumigatus in vivo* y se trataron con control (PBS, barras blancas) o SAP
50 (5 mg/kg, q2d, barras rellenas) en los días 15-30 tras la exposición a conidios vivos. En el día 30, se sacrificó a los ratones. A) Se midió la IL-10 en pulmón total mediante luminex, B-E) Se estimularon cultivos de esplenocitos *in vitro* con antígeno de *Aspergillus fumigatus*, en presencia o ausencia de SAP (figura 5). Se evaluaron los sobrenadantes libres de células para determinar los niveles de proteínas B) IL-10, C) IL-4, D) IL-5 y E) IFN- γ mediante ELISA. Los animales tratados con SAP (i.p., 2qd en los días 15-30) tuvieron niveles potenciados de IL10 en los pulmones en
55 comparación con el control de asma (PBS, i.p., q2d, en los días 15-30) y los niveles fueron comparables con el de pulmones sin tratar, no alérgicos (figura 5). Los esplenocitos de ratones tratados con SAP tienen una respuesta de recuerdo de antígeno de Th1 o Th2 reducida e IL-10 aumentada. Puesto que también hay un aumento en la

expresión de FoxP3, estos datos indican que SAP induce células T reguladoras dentro del entorno de la enfermedad alérgica de las vías respiratorias.

5 Aunque se han comentado las realizaciones específicas del contenido, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no limitativa. Muchas variaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones enumeradas a continuación. El alcance completo de la invención debe determinarse haciendo referencia a las reivindicaciones, junto con el alcance completo de equivalentes, y la memoria descriptiva, junto con tales variaciones.

Lista de secuencias

SEQ ID NO: 1 proteína de amiloide P sérico humano

HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLITPLEKPLQNFTLCFRAYS DLSRAYSLFSYNTQG
 RDNELLYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSSGIAEFWINGT
 PLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQEQDSYGGKFD RSQS FVGEIGDLYMWDSVLP
 10 ENILSAYQGTPLPANILDWQALNYEIRGYVIKPLVWV

SEQ ID NO: 2 proteína de amiloide P sérico de *Gallus gallus*

QEDLYRKVFVFREDPSDAYVLLQVQLERPLLNFTVCLRSYTDLTRPHSLFSYATK
 AQDNEILLFKPKPGEYRFYVGGKYVTFRVPENRG EW EHV CASWESGSGIAEFWL
 NGRPWPRKGLQKGYE V GNEA V VMLGQE Q D A Y G G G F D V Y N S F T G E M A D V H L W
 DAGLSPDKMRSAYLALRLPPAPLAWGRLRYEAKGDVVVKPRLREALGA

SEQ ID NO: 3 proteína de amiloide P sérico de *Bos taurus*

QTDLRGKVFVFPRESSTDHVTLITKLEKPLKNLTLCLRAYSDLSRGYSLFSYNIHS
 KDNELLVFKNGIGEYSLYIGKTKVTVRATEKFPSPVHICTSWESSTGIAEFWINGK
 PLVKRGLKQGYAVGAHPKIVLGQEQDSYGGGFDKNQSF MGEIGDLYMWDSVLS
 PEEILLVYQGSSSISPTILDWQALKYEIKGYVIVKPMVWG

15 SEQ ID NO: 4 proteína de amiloide P sérico de *Cricetulus migratorius*

QTDLTGKVFVFPRESESDYVVKLIPRLEKPLENFTLCFR TYTDLSRPHSLFSYNTKN
 KDNELLYKERMGEYGLYIENVGAIVRGV EEF ASPVHFCTSWESSSGIADFWVNG
 IPWVKKGLKKGYTVKTQPSIILGQE Q D N Y G G G F D K S Q S F V G E M G D L N M W D S V L
 TPEEIKSVYEGSWLEPNILDWRALNYEMSGYAVIRPRVWH

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de amiloide P sérico (SAP) para su uso en el tratamiento, la prevención o la reducción de la gravedad de una enfermedad alérgica de las vías respiratorias en un paciente.
- 5 2. Polipéptido de SAP para su uso según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
3. Polipéptido de SAP para su uso según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 10 4. Polipéptido de SAP para su uso según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 97% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 15 5. Polipéptido de SAP para su uso según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
6. Polipéptido de SAP para su uso según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de SAP comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
7. Polipéptido de SAP para su uso según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de SAP (i) inhibe la aparición de la enfermedad alérgica de las vías respiratorias o (ii) reduce el número de días en que el paciente está aquejado de la enfermedad alérgica de las vías respiratorias.
- 20 8. Polipéptido de SAP para su uso según la reivindicación 1 ó 7, en el que el paciente está en riesgo de desarrollar una enfermedad alérgica de las vías respiratorias.
9. Polipéptido de SAP para su uso según la reivindicación 8, en el que el polipéptido de SAP es para su administración antes de, simultáneamente con o tras un tratamiento que coloca al paciente en riesgo de desarrollar una enfermedad alérgica de las vías respiratorias.
- 25 10. Polipéptido de SAP para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el paciente padece una enfermedad alérgica de las vías respiratorias seleccionada de: rinitis alérgica, sinusitis alérgica, asma alérgica, broncoconstricción alérgica, disnea alérgica, aumento alérgico de producción de moco en los pulmones y neumonitis.
- 30 11. Polipéptido de SAP para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el polipéptido de SAP es para su administración mediante un modo seleccionado de: vía tópica, mediante inyección, mediante inyección intravenosa, mediante inhalación, liberación continua mediante depósito o bomba, o una combinación de los mismos.
- 35 12. Polipéptido de SAP para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el polipéptido de SAP es para su uso conjuntamente con un agente activo adicional.
13. Polipéptido de SAP para su uso según la reivindicación 12, en el que el agente activo se selecciona de: anticuerpos anti-IgE, agonistas beta a corto y largo plazo, corticosteroides, cromolina y xantinas.

Figura 1

Homo sapiens	H T D L S G K V F V F E R E S V T D H V N L I T P L E A P L
Gallus gallus	Q E D L Y R K V F V F R E D P S D A Y V L L Q V Q I E R P L
Bos taurus	Q T D L R G K V F V F P R E S S I D H V T L I I K L E K P L
C. migratorius	Q T D L T C K V F V F E R E S E S D Y V K L I T P R I E K P L
Homo sapiens	Q K F T L C F R A Y S D L S R A Y S I F S Y N T Q G R D N E
Gallus gallus	L N F T V C L K S Y T D L T P P H S L F S Y A F K A Q D N E
Bos taurus	K N L T L C L D A Y S D L S R G Y S L F S Y N I H S K D N E
C. migratorius	E N F T L C F R T Y T D L S R P H S L F S Y N T K N K D N E
Homo sapiens	L L V Y K E R V G E Y S L Y I G R H K V T S E V I E K F P A
Gallus gallus	I L L F K P K P G E Y R F Y V G G K Y V T F R V P E N R G E
Bos taurus	L L V F K N G I G E Y S L Y I G K T K V T V R A T E K F P S
C. migratorius	L L I Y K E R M G E Y G L Y I E N V G A I V R G V E E F A S
Homo sapiens	P V H I C V S W E S S S G I A E F W I N G I T P L V K K G L K
Gallus gallus	W E N V C A S W E S G S G I A E F W L N G R P W P R K G L Q
Bos taurus	P V H I C T S W E S S T G I A E F W I N G K P L V K R G L K
C. migratorius	P V H F C T S W E S S S G I A D F W V N G I P W V K K G L K
Homo sapiens	Q C Y T V E A Q P R I V L G Q E Q D E Y S G K F D R R Q S F
Gallus gallus	K G Y E V G N E A V V M L G Q E Q D A Y G G G F E V Y N S F
Bos taurus	Q C Y A V G A H P K I V L G Q E Q D E Y S G G F E K N G S F
C. migratorius	K G Y T V K T Q P S I I L G Q E Q D N Y S G G F E K S Q S F
Homo sapiens	V G E I G D L Y M W D S V L P P E N I L S A Y Q G T L P A
Gallus gallus	T G E M A D V H L W D A G L S P D K M R S A Y L A L R L P P
Bos taurus	M G E I G D L Y M W D S V I S P E E I L L V Y Q G S S S I S
C. migratorius	V G E M G D L N W W D S V L T P E E I K S V Y E G S W L E P
Homo sapiens	N I L D W Q A L M Y F T R G Y V T I K P L V W Y
Gallus gallus	A P L A * G R L R Y E A K S D Y V V K P R L R E A L G A
Bos taurus	P T I L D W Q A L K Y E I K G Y V T V K P M V W G
C. migratorius	N I L D W R A L N Y L M S G Y A V I R P R V W H

Figura 2A

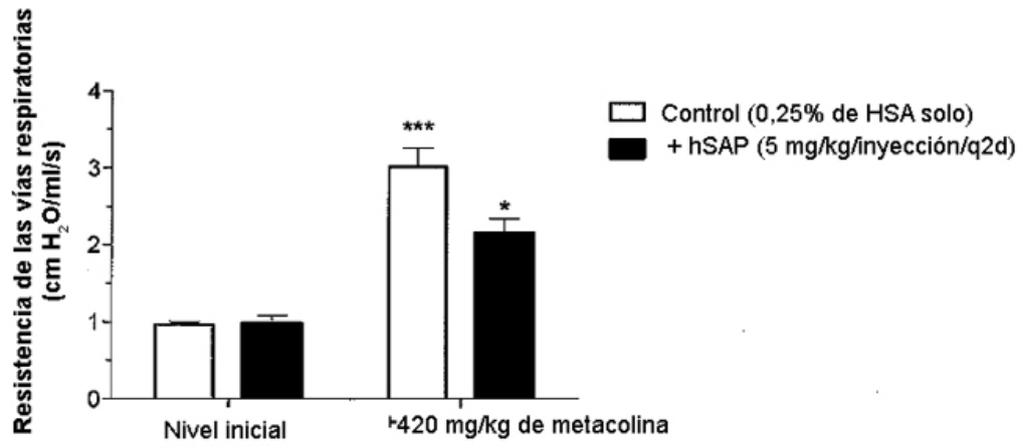


Figura 2B

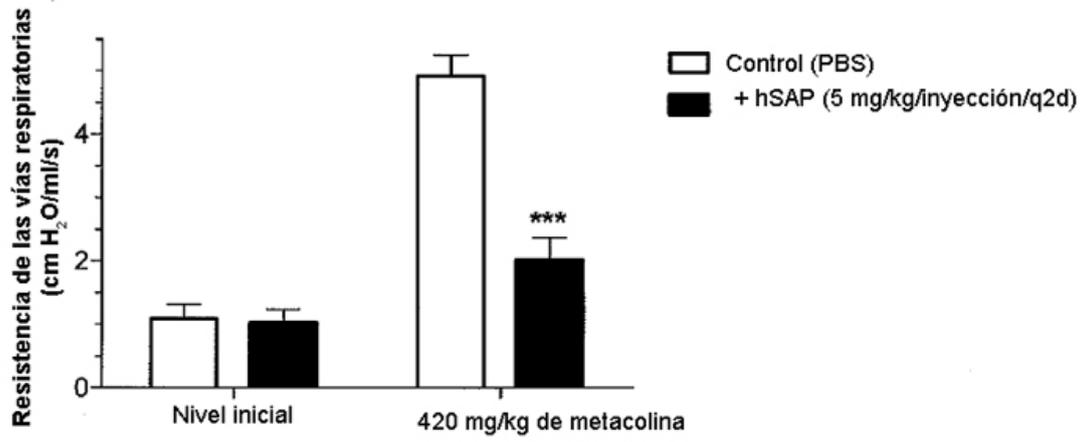


Figura 3A

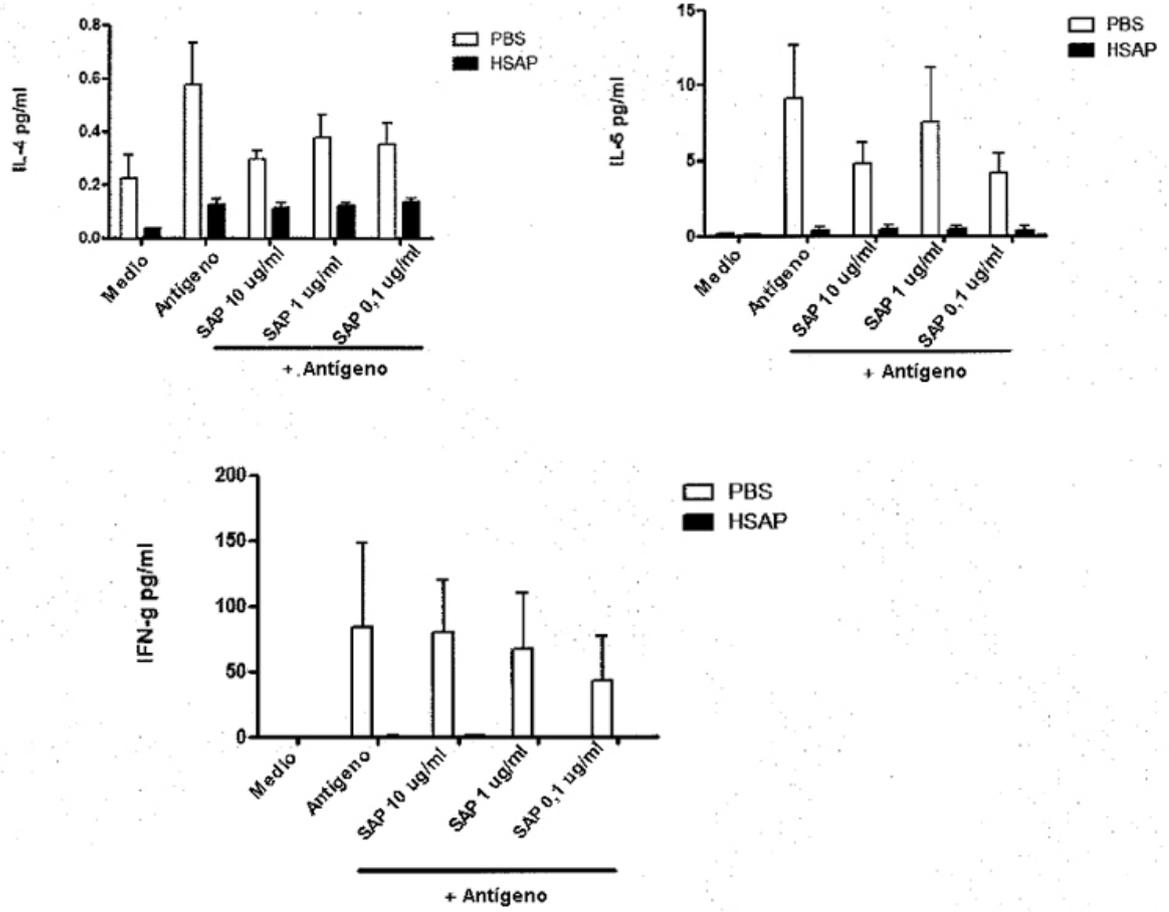


Figura 3B

B.

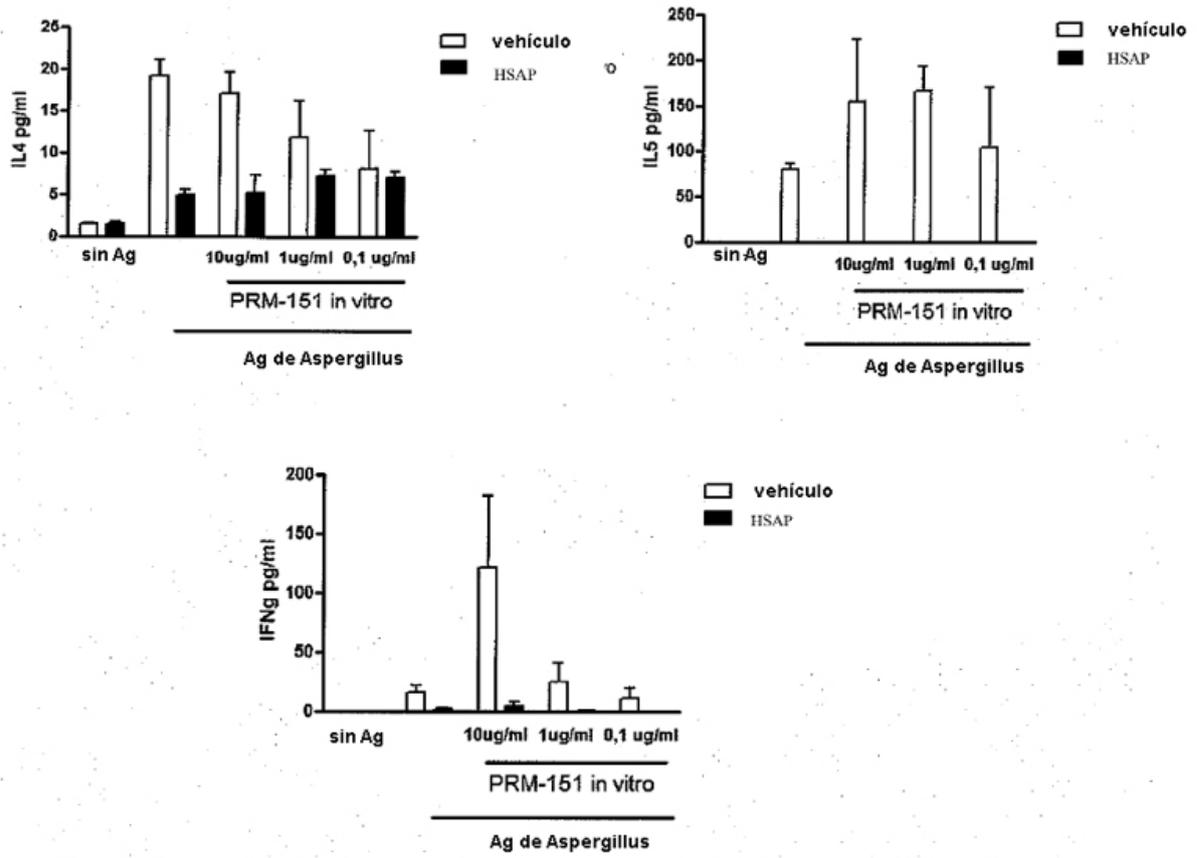


Figura 4.

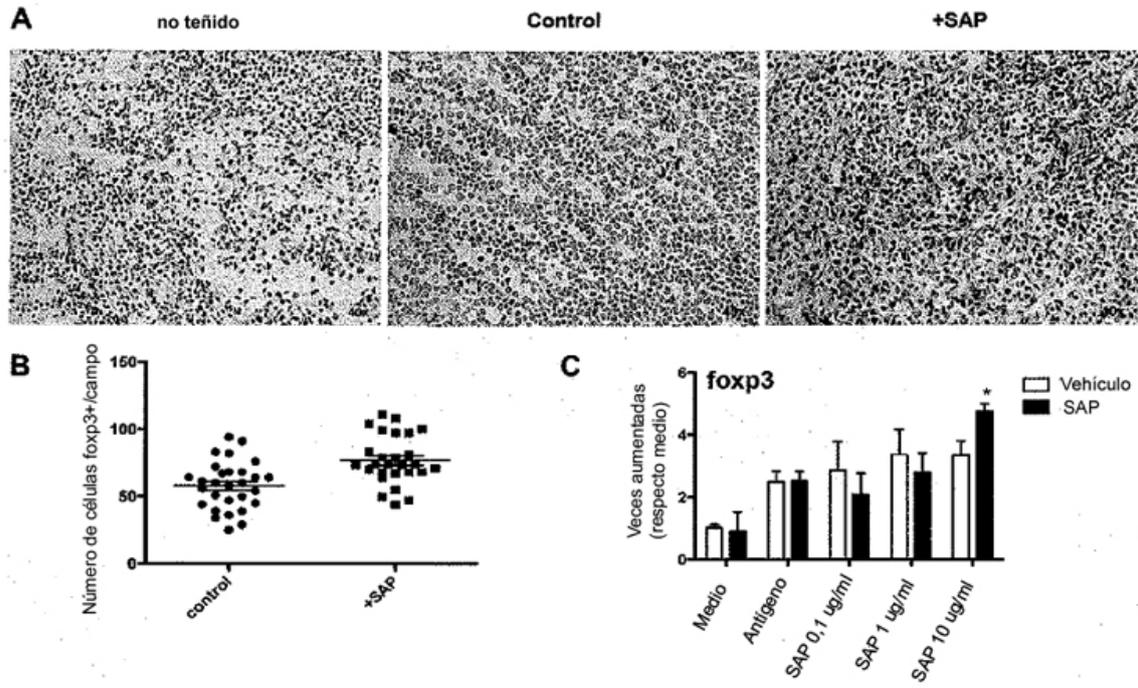


Figura 5.

