

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 881**

51 Int. Cl.:

C07K 16/42

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2010 PCT/FR2010/050894**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO2010128265**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10727776 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2427497**

54 Título: **Uso de inmunoglobulinas igg1 y/o de ligandos del receptor cd32 para el tratamiento de enfermedades y manifestaciones inflamatorias por vía mucosa.**

30 Prioridad:

07.05.2009 FR 0953057

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

08.06.2017

73 Titular/es:

**STALLERGENES (100.0%)
6, rue Alexis de Tocqueville
92160 Antony , FR**

72 Inventor/es:

**BATARD, THIERRY;
MOINGEON, PHILIPPE;
MASCARELL, LAURENT;
ZIMMER, ALINE y
NONY, EMMANUEL**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 615 881 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

Uso de inmunoglobulinas igg1 y/o de ligandos del receptor cd32 para el tratamiento de enfermedades y manifestaciones inflamatorias por vía mucosa

5

[0001] La presente invención se refiere al uso de anticuerpos anti-IgE de tipo IgG₁ con capacidad para unir las IgE a la superficie de los mastocitos o basófilos sin disociar dichas IgE de sus receptores y de entrecruzar las IgE fijadas a los receptores de la superficie de un mastocito o un basófilo, para el tratamiento de hipersensibilidades de tipo I.

10

[0002] Las alergias son reacciones de hipersensibilidad anormales, inadaptadas y excesivas del organismo provocadas por un contacto con un elemento, que suele ser externo, el alérgeno. Estas reacciones se clasifican en cuatro grupos en función de los mecanismos de dichas reacciones, que derivan en síntomas alérgicos. La alergia inmediata, o hipersensibilidad de tipo 1, se caracteriza por la liberación por los mastocitos y los basófilos de mediadores proinflamatorios, como la histamina, citocinas proinflamatorias y leucotrienos (Môbs et al. (2008) Int. Arch. Allergy Immunol. 147: 171-178) después de una estimulación inducida por el entrecruzamiento de IgE en la superficie de dichas células.

15

[0003] La aparición de una hipersensibilidad de tipo 1 está provocada por una serie de acontecimientos que implican a diferentes actores del sistema inmunitario. En primer lugar, las células presentadoras del antígeno y los linfocitos B específicos del alérgeno se encargan del alérgeno. Después algunos fragmentos de este alérgeno se presentan a través del complejo mayor de histocompatibilidad, o CMH, a linfocitos T lo que induce la activación de los linfocitos T específicos del alérgeno y a la secreción de IL-4 por estos. La activación de linfocitos B por estos linfocitos T en presencia de IL-4 y del alérgeno induce la diferenciación de dichos linfocitos B en plasmocitos secretores de IgE específicas del alérgeno. Las IgE así producidas se van a fijar por su fragmento Fc a la superficie de mastocitos y basófilos. El alérgeno, en un segundo contacto, entrecruza dichas IgE e induce la liberación de sustancias proinflamatorias por los basófilos y los mastocitos, en concreto a través de un fenómeno de desgranulación (Bush et al. (2004) Treat. Respir. Med. 3: 45-57; Strunck et al. (2006) N. Engl. J. Med. 354: 2689-2695). Estas sustancias son responsables de los síntomas de la alergia como el asma, la rinitis o la conjuntivitis.

20

25

30

[0004] Las IgE son conocidas por ser capaces de fijarse por su fragmento Fc a dos tipos de receptores, el receptor de alta afinidad RFc ϵ I y el receptor de baja afinidad RFc ϵ II, o CD23 (Klupal et al. (1997) J. Invest. Dermatol. 108: 336-342, Dierks et al. (1993) J. Immunol. 150: 2372-2382), los mastocitos y basófilos expresan fuertemente el RFc ϵ I.

35

[0005] Se ha considerado el uso de diferentes inmunoglobulinas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y de alergias.

[0006] Así, Nimmerjahn y Ravetch indican que las Ig intravenosas (IVIG) administradas en dosis elevadas permitan tratar enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Nimmerjahn y Ravetch (2007) JEM 204:11-15). Según los autores, el efecto antiinflamatorio observado con las IVIG puede estar relacionado con una población de IgG que transporta ácidos siálicos en los polisacáridos N- unidos al residuo Asn297 de la región Fc de dichas IgG. Más precisamente, esta actividad antiinflamatoria es dependiente de la sialilación por enlaces 2,6 de la antepenúltima galactosa de la cadena de N-glicosilaciones unidas al residuo Asn297 (Anthony et al. (2008) Science 320:373-376). En esta última publicación se propone administrar las IVIG por vía intravenosa para tratar enfermedades inflamatorias.

40

45

[0007] La solicitud internacional WO 2008/057634 por su parte propone utilizar un polipéptido que comprenda al menos una región Fc de IgG con un nivel de sialilación superior al de una preparación de anticuerpos no purificada, para tratar una enfermedad inflamatoria. En este tipo de estrategia, la sialilación de las IgG aparece como particularmente importante para obtener una mayor eficacia en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria.

50

[0008] La solicitud internacional WO 2009/079382 describe el uso de un polipéptido que comprende al menos una región Fc de IgG con un nivel de sialilación superior al de una preparación de anticuerpos no purificada para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. En ese caso también es necesaria la sialilación de las IgG para observar una actividad antiinflamatoria. Se han definido tres estados diferentes de las IgG según el nivel de sialilación de su región Fc (Anthony et al. (2008) Science 320:373-376). En su estado desialilado, las IgG conferirían una actividad citotóxica por su unión a los receptores de Fc activadores. Las IgG perderían su capacidad citotóxica por sialilación

55

del polisacárido unido a Fc, transformando así las IgG a un estado no reactivo, no inflamatorio, reduciendo la unión al receptor FcR. Además, las IgG se convertirían en antiinflamatorias por unión del ácido siálico 2,6 al receptor correspondiente. Se ha mostrado más precisamente que el efecto antiinflamatorio de estas IVIG en forma sialilada se debía a su unión con el receptor SIGNR, correspondiente al receptor humano DC-SIGN (Anthony et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Science 105:19571-19578). El receptor SIGN-R1 está localizado, en el ratón, en los macrófagos de la zona marginal del bazo, mientras que su homólogo humano DC-SIGN se encuentra en las células dendríticas.

[0009] Para obtener un efecto antiinflamatorio óptimo, es necesario por tanto que los receptores SIGN-R1/DCSIGN sean directamente accesibles a las inmunoglobulinas administradas. Sin embargo, los presentes inventores han mostrado que dichos receptores solo se encontraban en el tejido muscular de la lengua, lejos del lugar de administración en caso de administración por vía sublingual. Por consiguiente, el uso de las IVIG no es apropiado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias por vía mucosa.

[0010] Por último, la solicitud internacional WO 2003/041731 describe el uso para el tratamiento de la alergia de un compuesto que comprende un dominio Fc de IgG, específico del receptor FCγ, y un dominio de fijación a un alérgeno.

[0011] De forma sorprendente, los inventores han observado una mejora de los síntomas del asma alérgica administrando por vía sublingual anticuerpos de tipo IgG₁, en forma sialilada o no, y sin que dicha mejora esté relacionada con un idiotipo particular. Paralelamente han puesto demostrado que los tejidos de las encías humanas comprenden una proporción más importante de receptores CD32 que de receptores activadores CD16, en particular, en las papilas dérmicas. Sin estar unido por un mecanismo de acción, el efecto antiinflamatorio observado con los anticuerpos de tipo IgG₁ (algunos de los cuales no son sialilados) administrados por vía sublingual podría mediar por su unión a los receptores CD32.

[0012] Además, una estrategia de terapia de la alergia descrita en la técnica anterior consiste en centrarse específicamente en las IgE.

[0013] Por tanto se ha planteado la disminución de linfocitos B secretores de IgE. En la solicitud de patente WO2008116149, se han preparado anticuerpos anti-IgE capaces de reconocer epítopos particulares de las IgE de superficie de linfocitos B. Dichos anticuerpos producen el entrecruzamiento de las IgE de superficie e inducen, a falta de otras señales, la apoptosis de los linfocitos B. Otra particularidad de dichos anticuerpos anti-IgE es que no reconocen las IgE en la superficie de los basófilos y de los mastocitos, para evitar el entrecruzamiento de dichos anticuerpos en la superficie de dichas células, entrecruzamiento que conllevaría la liberación de sustancias proinflamatorias.

[0014] En WO2010033736 se describe una alternativa que consiste en inhibir los linfocitos B secretores de IgE utilizando moléculas capaces de unir a la vez las IgE de superficie y CD32B. En particular se han utilizado anticuerpos anti-IgE mutados para aumentar la afinidad de la región Fc con CD32B.

[0015] Otras investigaciones también han intentado evitar las manifestaciones clínicas de la alergia, impidiendo la fijación de las IgE a la superficie de los basófilos y de los mastocitos.

[0016] Así, un anticuerpo anti-IgE humana de tipo IgG_{1k} humanizado al 95 % ha sido desarrollado y utilizado en terapia con el nombre de Omalizumab, comercializado con la marca Xolair (Genentech/Novartis). Dicho anticuerpo ha sido producido de forma que presenta dos características esenciales. En primer lugar inhibe la unión de las IgE a los receptores RFcε1 que se encuentran en la superficie de los mastocitos y de los basófilos, uniéndose a un epítopo de la molécula de IgE circulante que está implicado en dicha unión (Presta et al. (1993) J. Immunol. 151: 2623-2632). Seguidamente, y por consiguiente, dicho anticuerpo es incapaz de reconocer los anticuerpos IgE fijados a los basófilos o los mastocitos, porque el punto de fijación está oculto. Esta última característica parecía esencial para evitar la activación de dichas células que se produciría si el anti-IgE fuera capaz de reconocer las IgE de superficie y por consiguiente de entrecruzarlas, a la manera de un alérgeno.

[0017] El uso de dicho anticuerpo ha permitido disminuir la intensidad de los síntomas alérgicos secuestrando y produciendo la eliminación de las IgE circulantes, lo que, a través de un retrocontrol, induce el descenso del número de receptores RFcε1 en los mastocitos de los basófilos (Bush et al. (2004) Treat. Respir. Med. 3: 45-57, Saini et al. (1999) J. Immunol. 162: 5624-5630). Sin embargo, la indicación de Omalizumab sigue estando limitada al tratamiento de adolescentes (de 12 años o más) y de adultos que sufran un asma persistente moderada a severa, que presenten igualmente una prueba cutánea positiva o una reactividad *in vitro* a un aeroalérgeno perianual, y en

- quienes un tratamiento por corticoides inhalados no permite controlar dicho asma (Bang et al. (2004) BioDrugs 18: 415-418). Esta limitación en el uso se debe en particular a un cierto número de efectos secundarios y defectos del Omalizumab, así como a la falta de información sobre el efecto del Omalizumab a largo plazo. Entre los efectos secundarios se puede citar en particular las reacciones locales en el punto de inyección (Omalizumab: new drug
- 5 (2007) Prescrire Int. 16: 179-182), la reaparición de una poliposis nasal (Tonnel et al. (2006) N. Engl. J. Med. 355: 1282), una insuficiencia suprarrenal subaguda (Tonnel et al. (2006) N. Engl. J. Med. 355:1282), y la inducción posible de un síndrome de Churg y Strauss (Winchester et al. (2006) N. Engl. J. Med. 355: 1281-1282). Se han observado asimismo reacciones de anafilaxia (Omalizumab: new drug (2007) Prescrire Int. 16: 179-182), de forma que el producto debe administrarse obligatoriamente bajo un estricto control médico. Además, el paciente debe ver a
- 10 un médico cada dos o cuatro semanas para recibir entre una y tres inyecciones subcutáneas del producto. Teóricamente el tratamiento debe tomarse de por vida, en la medida en que los efectos que conducen a la mejoría de los síntomas (disminución de las IgE circulantes y disminución del número de receptores en la superficie de los basófilos) son reversibles cuando se deja el tratamiento (Saini et al. (1999) J. Immunol. 162: 5624-5630).
- 15 **[0018]** También es posible que la eliminación de más del 95 % de las IgE circulantes sea problemática en la medida en que las IgE pueden desempeñar una función importante en la lucha contra las parasitosis (Cooper et al. (2008) Allergy 63: 409-417) y/o contra los cánceres (Gould et al. (1999) Eur. J. Immunol. 29: 3527-3537, Karagiannis et al. (2003) Eur. J. Immunol. 33: 1030-1040, Karagiannis et al. (2007) J. Immunol. 179: 2832-2843, Karagiannis et al. (2008) Cancer Immunol. Immunother. 57: 247-263). De hecho, los estudios clínicos han mostrado que en los
- 20 pacientes tratados por Omalizumab aumentaban sus probabilidades de contraer cánceres de diferentes tipos (0,5 %), en comparación con pacientes que tomaban placebo (0,2 %).
- [0019]** Por último, el tratamiento con Omalizumab puede ser oneroso.
- 25 **[0020]** Para reducir las cantidades de anticuerpos anti-IgE administrados durante el tratamiento, se han descrito anticuerpos mejorados dirigidos contra las IgE con una alta afinidad con estas. Así la solicitud de patente EP2000481 ha descrito anticuerpos anti-IgE que bloquean la unión de las IgE a su receptor de alta afinidad RFc ϵ 1 para un uso en terapia así como para el diagnóstico de la alergia.
- 30 **[0021]** En la solicitud WO2008123999, los anticuerpos anti-IgE utilizados son anticuerpos humanos, lo que permite evitar el riesgo de una reacción inmunitaria dirigida contra anticuerpos murinos humanizados.
- [0022]** La solicitud EP0550020 describe por su parte anticuerpos capaces de reconocer las IgE fijadas a la superficie de los mastocitos y basófilos y disociarlas de sus receptores en la superficie de dichas células. Así, estos
- 35 anticuerpos no inducen el entrecruzamiento de las IgE y por tanto la liberación de mediadores proinflamatorios.
- [0023]** Otros anticuerpos capaces de unir las IgE fijadas a la superficie de los mastocitos y basófilos sin entrecruzarlos se describen en la solicitud WO0050460.
- 40 **[0024]** El conjunto de estos estudios relativos a los anticuerpos anti-IgE como vectores de tratamiento de las alergias inmediatas coincide en el hecho de que dichos anticuerpos anti-IgE deben ser necesariamente incapaces de entrecruzar las IgE en la superficie de los mastocitos y basófilos, para evitar la liberación de mediadores proinflamatorios inducida por dicho entrecruzamiento. Además, algunos de estos estudios, si no todos, conducen a la eliminación de la totalidad de las IgE circulantes, lo que, como se ha mencionado anteriormente, puede tener
- 45 efectos secundarios molestos.
- [0025]** Los métodos actuales de tratamiento de las alergias con ayuda de anticuerpos anti-IgE por tanto son insatisfactorios, habida cuenta de las desventajas mencionadas anteriormente.
- 50 **[0026]** Actualmente los inventores han mostrado que una inmunoglobulina de tipo IgG₁, en particular anti-IgE, y en particular una IgG₁ anti-IgE con capacidad de entrecruzar las IgE en la superficie de los mastocitos y basófilos, induce de manera sorprendente una mejora de los síntomas del asma alérgica cuando se administra por vía sublingual.
- 55 *Definiciones*
- [0027]** En la presente solicitud los términos «anticuerpo» e «inmunoglobulina» tienen el mismo significado y se utilizan indistintamente. Un anticuerpo corresponde a una inmunoglobulina así como a las porciones inmunológicamente activas de las inmunoglobulinas, siendo éstas moléculas que contienen los puntos de fijación

específicos de un antígeno dado.

[0028] El término anticuerpo abarca el anticuerpo completo así como las variantes del anticuerpo, incluyendo derivados como los anticuerpos humanizados. En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están unidas una a la otra por puentes disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera también por un puente disulfuro. Hay dos tipos de cadenas ligeras: las cadenas ligeras lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases principales de cadenas pesadas que determinan la actividad funcional del anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios diferentes. La cadena ligera contiene dos dominios: un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada contiene cuatro o cinco dominios según las clases de anticuerpos: un dominio variable (VH) y de tres a cuatro dominios constantes (CH1, CH2 y CH3 y eventualmente CH4, agrupados bajo la denominación de CH). Las regiones variables de cada una de las cadenas ligeras (VL) y pesadas (VH) determinan la especificidad del antígeno y el punto de fijación en este antígeno.

[0029] Los dominios constantes de las cadenas ligeras (CL) y pesadas (CH) confieren al anticuerpo propiedades biológicas importantes, como la asociación de cadenas de anticuerpos entre ellas, la movilidad a través de la placenta, la fijación del complemento y/o la unión a los receptores Fc (FcR). El fragmento Fv corresponde a la parte N-terminal del fragmento Fab, descrito más adelante, de la inmunoglobulina, y comprende las porciones variables de una cadena ligera y de una cadena pesada (VL y VH). La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el punto de reconocimiento del anticuerpo y el determinante antigénico. El punto de reconocimiento del anticuerpo está constituido esencialmente por residuos que provienen de regiones hipervariables o que determinan la complementariedad (CDRs). Ocasionalmente, los residuos que provienen de las regiones no hipervariables o regiones estructurales o de armazón («framework» o FR) influyen en la estructura general del dominio y por tanto en los puntos de reconocimiento. El término «regiones de complementariedad» (CDR) se refiere a las secuencias de aminoácidos, que juntas, definen la afinidad de la fijación y la especificidad de la región Fv natural del punto de fijación de una inmunoglobulina nativa.

[0030] Cada una de las cadenas pesadas y cada una de las cadenas ligeras de una inmunoglobulina posee tres regiones CDR, designadas como L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 respectivamente. El punto de fijación del antígeno incluye por tanto estas seis CDRs, que comprenden las CDRs de cada una de las cadenas pesadas y ligeras de una región variable.

[0031] Las regiones estructurales (FRs) corresponden a las secuencias de aminoácidos situadas en las regiones CDR, es decir, porciones de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas que están relativamente conservadas entre diferentes inmunoglobulinas de una misma especie (Kabat et al. (1991) National Institutes of Health, Bethesda, Md). El término «región estructural humana» se utiliza para designar una región estructural que es esencialmente idéntica (aproximadamente el 85 %, preferiblemente el 90 %, 95 % o 100 %) a la región estructural de un anticuerpo humano natural.

[0032] Como el experto en la materia sabe, se pueden distinguir cuatro subclases de anticuerpos de tipo IgG: IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Estas subclases se distinguen por las regiones constantes de sus cadenas γ (γ 1 a γ 4). Si no hay menos del 95 % de identidad de secuencia entre los dominios, las regiones bisagra son notablemente diferentes, lo que determina comportamientos fisicoquímicos y propiedades efectoras diversas.

[0033] El término «anticuerpo monoclonal» o «mAb» (de «monoclonal Antibody») designa un anticuerpo con composición de aminoácidos única, que se dirige contra un antígeno específico y que puede producirse por un solo clon de células B, o hibridoma. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser recombinantes, es decir, producirse por técnicas de ingeniería de proteínas.

[0034] El término «anticuerpo antidiotípico» designa un anticuerpo dirigido contra los determinantes antigénicos presentes en los dominios variables de otra inmunoglobulina, ya sea en las CDR o en el exterior.

[0035] El término «anticuerpo quimérico» significa un anticuerpo recombinante que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo que proviene de un animal no humano, asociado con un dominio CH y un dominio CL de otro anticuerpo, en particular de un anticuerpo humano. El animal no humano puede ser un ratón, una rata, un conejo, un hámster, etc. El término «anticuerpo quimérico» también puede utilizarse para describir un anticuerpo multiespecífico, es decir, específico de al menos dos antígenos diferentes.

[0036] El término «anticuerpo humanizado» significa un anticuerpo humano (anticuerpo aceptador) en el que

las regiones de complementariedad (CDR) se sustituyen por regiones CDRs, que constituyen el punto de unión al antígeno, y que tienen como origen un anticuerpo donante específico del antígeno. Eventualmente, el anticuerpo humano aceptador recibe, además de las regiones CDRs, aminoácidos de la región estructural del anticuerpo donante.

5

IgG₁ y ligandos del receptor CD32

[0037] La invención se refiere a una inmunoglobulina de tipo IgG₁ para un uso para el tratamiento de una hipersensibilidad de tipo 1, en el que la inmunoglobulina se administra por vía mucosa, en particular por vía sublingual. La inmunoglobulina de tipo IgG₁ es un anticuerpo anti-IgE con capacidad para unir las IgE a la superficie de los mastocitos o los basófilos sin disociar dichas IgE de sus receptores y de entrecruzar las IgE fijadas a los receptores a la superficie de los mastocitos o los basófilos.

[0038] Las inmunoglobulinas de tipo IgG₁ según la invención pueden encontrarse en particular en, o en forma de, una composición de inmunoglobulinas intravenosas, también llamadas IgIV o IVIG.

[0039] Como el experto en la materia sabe, las inmunoglobulinas intravenosas son preparaciones terapéuticas de IgG humanas normales obtenidas a partir de una mezcla de plasmas provenientes de más de 1000 individuos sanos. Generalmente se trata cuasiexclusivamente de IgG intactas de una semivida de 3 a 4 semanas y de repartos en subclases similares a las observadas en el suero humano normal. Las IVIG contienen típicamente menos del 5 % de IgG agregadas, del 0 al 7 % de fragmentos F(ab')₂ de IgG, y según las preparaciones comerciales, de 0,06 a 40 mg de IgA por gramo de proteínas. Las IgG comprendidas en las IVIG tienen un largo espectro de reactividades y se dirigen por tanto contra antígenos exógenos, autoantígenos y anticuerpos.

[0040] Además, como los inventores han detectado una elevada densidad de receptores CD32 en las papilas dérmicas, que corresponden a la zona en la que las inmunoglobulinas y las proteínas, en general, se difunden cuando son administradas por vía sublingual, han concluido que cualquier ligando de CD32 era utilizable por vía sublingual para inducir tratar enfermedades y manifestaciones inflamatorias. Más generalmente, cualquier ligando de CD32 puede utilizarse por vía mucosa para tratar enfermedades y manifestaciones inflamatorias, en la medida en que esta mucosa presenta una fuerte densidad de receptores CD32.

[0041] La demanda describe igualmente una IgG₁, ligando del receptor CD32, preferentemente un ligando del receptor CD32B, para un uso en el tratamiento de una enfermedad o manifestación inflamatoria, de la alergia o de una enfermedad autoinmunitarias, el ligando administrado por vía mucosa, en particular por vía sublingual.

35

[0042] Los términos «receptor CD32» y «receptor FcγRII» se utilizan indistintamente y hacen referencia a una proteína receptora de superficie presente en la mayoría de las células inmunitarias y que se une al fragmento Fc de las inmunoglobulinas. Como sabe el experto en la materia, los receptores CD32 comprenden un grupo de receptores que incluyen las isoformas CD32A, y CD32B y CD32C, todas presentan dos dominios extracelulares. CD32A se expresa en los monocitos, los macrófagos, los neutrófilos y las plaquetas. CD32C se expresa en las células NK. CD32B por último, que incluye dos isoformas CD32B1 y CD32B2, se expresa en los linfocitos B, los basófilos, los mastocitos, los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas.

[0043] CD32A inicia la endocitosis, la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos y la liberación de los mediadores de la inflamación. CD32B transduce señales inhibitorias que regulan a la baja las funciones inmunitarias desencadenadas por los receptores activadores. En particular CD32B inhibe la activación de los mastocitos, de los basófilos, de los linfocitos B y de los linfocitos T. Se compone de 2 dominios extracelulares de tipo Ig, que unen la región Fc de las IgG, un dominio transmembranario y una cola intracitoplásmica con un motivo inhibidor basado en las estructuras tirosínicas del receptor inmunitario (ITIM). La activación de CD32B lleva al reclutamiento de fosfatasa en el motivo ITIM, que inhiben la activación de la señal que viene de otros receptores activadores.

[0044] Preferentemente, el receptor CD32 corresponde a la isoforma CD32B.

[0045] Por «ligando del receptor CD32», se entiende aquí las moléculas que se unen de forma específica al receptor CD32 e inducen preferentemente la señal mediada por CD32.

[0046] El experto en la materia conoce técnicas que permiten identificar ligandos del receptor CD32, en particular ligandos del receptor CD32B. Incluyen en particular las técnicas que comprenden:

- a) la puesta en contacto del ligando candidato con (i) un receptor CD32, en particular un receptor CD32B, recombinante o un péptido derivado del receptor CD32, en particular del receptor CD32B; o con (ii) una célula indicadora proveniente de estirpes celulares que expresan CD32, en particular CD32B, en su superficie; y
 5 b) la determinación de la inducción de la señal mediada por CD32 en particular por CD32B.

[0047] Las células indicadoras pueden ser por ejemplo células IIA1.6 CD32 positivas (Van den Herik-Oudjik et al. (1995) Blood. 85:2202-11).

- 10 **[0048]** La determinación de la inducción de la señal mediada por CD32, en particular mediada por CD32B, puede por ejemplo consistir en determinar el perfil de fosforilación del motivo ITIM del receptor CD32, en particular del receptor CD32B, después de ponerse en contacto con el ligando candidato. Puede comprender igualmente pruebas de inhibición de la movilización del calcio y/o pruebas de inhibición de la secreción de citocinas, como IL-2.

- 15 **[0049]** Así, los ligandos candidatos que inducen una desfosforilación del motivo ITIM del receptor CD32, en particular del receptor CD32B, y/o que inhiben la movilización del calcio y/o inhiben la secreción de IL-2 pueden considerarse como ligandos del receptor CD32, en particular ligandos del receptor CD32B.

- [0050]** Por ejemplo, en la solicitud americana US2007/0135621 también se describen ejemplos de técnicas
 20 de identificación de ligandos del receptor CD32.

[0051] El ligando del receptor CD32 según la invención es una IgG₁ anti-IgE con capacidad para unir las IgE a la superficie de los mastocitos o basófilos sin disociar dichas IgE de sus receptores y de entrecruzar las IgE fijadas en los receptores a la superficie de los mastocitos o basófilos.

25

[0052] Una inmunoglobulina de tipo IgG₁ puede en particular ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado, como los que se han definido anteriormente.

- [0053]** Según un modo de realización preferido, cuando la inmunoglobulina según la invención es un
 30 anticuerpo quimérico como el que se ha definido más arriba, los dominios CH y CL asociados a los dominios VH y VL provienen de una inmunoglobulina humana de tipo IgG₁.

- [0054]** Según otro modo de realización particularmente preferido, la inmunoglobulina que se une al receptor
 35 CD32 se une al receptor a través de su región Fc.

[0055] Los inventores han mostrado que, de forma sorprendente, las inmunoglobulinas de cualquier idiotipo, y no solamente de los anticuerpos anti-IgE, eran capaces de inducir una mejora de los síntomas de asma alérgica cuando se administraban por vía sublingual.

- 40 **[0056]** Por «alérgeno» se entiende aquí cualquier sustancia que desencadene una alergia. Algunos ejemplos de alérgenos pueden ser, a título no limitativo, alérgenos de polen (de árboles, de gramíneas, etc.), alérgenos de ácaros (de polvo doméstico o de almacenamiento), alérgenos de insecto (de himenópteros, de cucarachas, etc.), alérgenos de animales (de perro, de gato, de caballo, de rata, de ratón, etc.), alérgenos de enmohecimiento y alérgenos alimentarios. El alérgeno puede ser por ejemplo uno de los alérgenos enumerados en la sección
 45 «Aplicaciones terapéuticas».

- [0057]** Por «antígeno» se entiende cualquier sustancia capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria con el objetivo de eliminarlo del organismo. Se trata generalmente de una sustancia ajena al organismo. En el caso de las enfermedades autoinmunitarias, el antígeno puede ser un antígeno propio reconocido erróneamente como
 50 extraño por el organismo (autoantígeno).

- [0058]** Por «citocina» se entiende aquí cualquier proteína, que no sea un anticuerpo, secretada por una célula en contacto con un antígeno específico y que tenga una función de mediador celular en la generación de una respuesta inmunitaria. Algunos ejemplos de citocinas pueden ser, a título no limitativo, interferones, como FN-α, IFN-β, IFN-ω e IFN-γ; interleucinas, como 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-17, IL-18 e IL-23; quimiocinas como las quimiocinas de la familia CXC, las quimiocinas de la familia CC, las quimiocinas de la familia CX3C y las quimiocinas de la familia C; el TNF, los CSF y los TGF.
 55

[0059] La inmunoglobulina según la invención es un anticuerpo anti-IgE de tipo IgG₁ con capacidad para unir

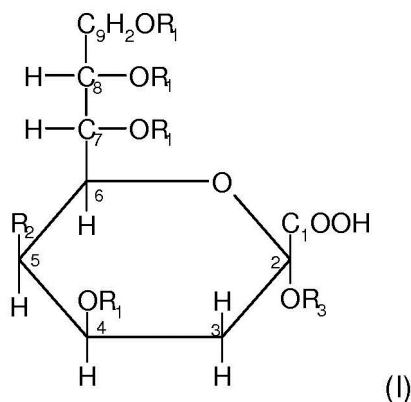
las IgE a la superficie de los mastocitos o basófilos sin disociar dichas IgE de sus receptores y de entrecruzar las IgE fijadas a los receptores en la superficie de los mastocitos o basófilos.

5 **[0060]** Los inventores han mostrado además de forma sorprendente que era posible inducir una mejora de los síntomas alérgicos utilizando inmunoglobulinas, en particular IgG₁, estuvieran estas en forma sialilada o no sialilada.

[0061] Así, según un modo de realización particularmente preferido de la invención, las inmunoglobulinas según la invención no se encuentran en forma sialilada.

10 **[0062]** Por «sialilación» se entiende aquí la adición de un residuo de ácido siálico en una proteína, que puede ser en particular una glicoproteína.

[0063] En el contexto de la invención, el término «ácido siálico» incluye una familia de azúcares que
15 contienen 9 átomos de carbono o más, que comprende un grupo carboxilo. Una estructura genérica que engloba todas las formas naturales de ácido siálico se muestra en la siguiente fórmula (I):



20 en la que

los grupos R₁ con posiciones variadas sobre una sola molécula pueden ser idénticos o diferentes unos de otros. R₁ puede ser un hidrógeno o un grupo acetilo, lactilo, metilo, sulfato, fosfato, anhidro, ácido siálico, fucosa, glucosa o galactosa; R₂ puede ser un grupo N-acetilo, N-glicolilo, amino, hidroxilo, N-glicolil-O-acetilo o N-glicolil-O-metilo; R₃
25 representa el residuo de azúcar precedente en un oligosacárido al que el ácido siálico está unido en el contexto de una glicoproteína. R₃ puede ser una galactosa (conectada en posición 3, 4, 5 o 6), una N-acetilgalactosamina (conectada en posición 6), una N-acetilglucosamina (conectada en posición 4 o 6), un ácido siálico (conectado en posición 8 o 9) o un ácido 5-N-glicolil-neuramínico.

30 **[0064]** Se encuentran más de 40 formas de ácido siálico en la naturaleza entre los cuales están el ácido N-actilneuramínico, el ácido N-glicolilneuramínico y sus derivados O-acetilados, en particular el ácido N-acetil-9-O-acetilneuramínico. La forma de ácido siálico más común es el ácido N-acetilneuramínico, en el que R₁ es un hidrógeno en todas las posiciones y R₂ es un grupo N-acetileno.

35 **[0065]** En el contexto de la invención se entiende por «inmunoglobulina en forma sialilada» una inmunoglobulina que contiene al menos un ácido siálico como el que se ha definido más arriba.

[0066] En el contexto de la invención se entiende por «inmunoglobulina que no está en forma sialilada» o
40 «inmunoglobulina en forma no sialilada» una inmunoglobulina que no contiene ácido siálico como el que se ha definido más arriba.

Anticuerpos anti-IgE con capacidad para unir las IgE fijadas a sus receptores a la superficie de un mastocito y/o basófilo

- [0067]** La invención se refiere además a un anticuerpo anti-IgE de tipo IgG₁ con capacidad de unir las IgE fijadas a sus receptores a la superficie de un mastocito o basófilo sin disociar dichas IgE de sus receptores y con capacidad de entrecruzar las IgE fijadas a los receptores en la superficie de los mastocitos o basófilos, destinado a ser utilizado en el tratamiento de una alergia inmediata o hipersensibilidad de tipo 1.
- [0068]** Por «receptor en las IgE» se entiende el receptor RFcε1, presente en la superficie de un mastocito y/o un basófilo.
- 10 **[0069]** Un anticuerpo anti-IgE según la invención puede en particular ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado, como los que se han definido anteriormente.
- [0070]** Más particularmente, el anticuerpo anti-IgE según la invención puede ser un anticuerpo antidiotípico o no. Así, el anticuerpo anti-IgE según la invención puede unirse a cualquier IgE, sea cual sea la especificidad de dicha IgE, o al contrario, el anticuerpo anti-IgE solo puede unirse a una IgE específicamente dirigida contra un antígeno o un alérgeno particular.
- 15 **[0071]** Según un modo de realización preferido, cuando el anticuerpo anti-IgE según la invención es un anticuerpo quimérico como el que se ha definido más arriba, los dominios VH y VL asociados a los dominios CH y CL provienen de un anticuerpo dirigido contra las IgE humanas.
- 20 **[0072]** Según otro modo de realización preferido, cuando el anticuerpo anti-IgE según la invención es un anticuerpo humanizado como el que se ha definido más arriba, el anticuerpo donante es un anticuerpo de ratón, de rata, de conejo, de hámster, etc. y es específico de las IgE humanas. Por ejemplo, se pueden injertar CDRs de un anticuerpo de ratón específico de las IgE humanas en la región estructural de un anticuerpo humano para preparar un «anticuerpo humanizado» específico de las IgE humanas.
- [0073]** Preferentemente, el anticuerpo anti-IgE según la invención es un anticuerpo humano o humanizado.
- 30 **[0074]** Las IgE son capaces de unirse por sus fragmentos constantes Fc a los receptores Recε1 presentes en la superficie de los mastocitos y basófilos. El anticuerpo anti-IgE según la invención tiene la capacidad de unirse a las IgE fijadas a los receptores RFcε1 de un mastocito o basófilo sin disociar dichas IgE de sus receptores.
- [0075]** Se han hecho investigaciones previas sobre las regiones implicadas en la unión de IgE con los receptores RFcε1. Dichas regiones han sido identificadas como el dominio Cε3 y parcialmente el dominio Cε4 (Schwarzbaum et al. (1989) Eur. J. Immunol. 19: 1015-1023), o el dominio Cε2, Cε3 y la región entre los dominios Cε2 y Cε3 (Takemoto et al. (1994) Microbiol. Immunol. 38: 63-71).
- 35 **[0076]** Por tanto es preferible, según la invención, que el anticuerpo anti-IgE reconozca una parte de la IgE no implicada en la fijación de la IgE a su receptor en los mastocitos o basófilos. De forma preferente, el anticuerpo anti-IgE según la invención puede reconocer las partes de los dominios Cε2, Cε3 Cε4 no implicadas en la unión al receptor RFcε1, el dominio Cε1, los dominios variables de la cadena pesada (VH) o de la cadena ligera (VL) así como el dominio constante de la cadena ligera de las IgE (CL).
- 40 **[0077]** De forma general, el experto en la materia puede comprobar la capacidad de un anticuerpo dado para fijarse a las IgE unidas al receptor RFcε1 mediante métodos habituales en el ámbito técnico. Por ejemplo, el experto en la materia puede comprobar que la adición de anticuerpos anti-IgE no impide la fijación de la IgE a los receptores RFcε1 a la superficie de basófilos o mastocitos. Según su especificidad, el anticuerpo anti-IgE según la invención puede eventualmente impedir el reconocimiento del alérgeno por la IgE, por ejemplo creando un impedimento estérico en el punto de reconocimiento del antígeno.
- 45 **[0078]** El anticuerpo anti-IgE tiene la capacidad de entrecruzar las IgE fijadas en sus receptores a la superficie de un mastocito y de un basófilo.
- 50 **[0079]** El término «entrecruzamiento de las IgE» se refiere al establecimiento de uniones cruzadas entre dos IgE unidas cada una a un receptor RFcε1 en la superficie de un mastocito o de un basófilo. Dichas uniones cruzadas están provocadas por el reconocimiento de al menos dos IgE, unidas a receptores RFcε1 en la misma célula, por una misma molécula entrecruzante (alérgeno, anticuerpo anti-IgE) e inducen la activación de mastocitos o basófilos.

[0080] Cuando se entrecruza una cantidad suficiente de IgE de superficie, es decir, cuando está presente una cantidad suficiente, llamada «cantidad óptima», de moléculas entrecruzantes, los enlaces cruzados pueden inducir la desgranulación de los mastocitos y basófilos y conducir a la liberación de mediadores proinflamatorios.

5 **[0081]** Dicha capacidad entrecruzante de las IgE puede ser evaluada por el experto en la materia, por ejemplo, mediante un análisis celular que permita detectar la desgranulación o la activación de los mastocitos o los basófilos en presencia de una cantidad óptima de anticuerpos anti-IgE. La desgranulación puede por ejemplo estimarse a través de la medición de la cantidad de histamina o de β -hexosaminidasa liberada durante dicha desgranulación o por la medición, en citometría de flujo por ejemplo, de la presencia de CD63 y/o de CD107a en la
10 superficie de los mastocitos o los basófilos.

[0082] Alternativamente, también se puede medir la activación de las células tras el entrecruzamiento en presencia de anticuerpos anti-IgE en citometría de flujo, midiendo la presencia de CD203c en la superficie de los mastocitos o los basófilos. El anticuerpo anti-IgE puede analizarse en ese caso con una concentración «subóptima»
15 que se refiere aquí a una concentración de anticuerpos anti-IgE insuficiente para inducir la desgranulación de los mastocitos o basófilos.

[0083] Los anticuerpos anti-IgE según la invención son específicos de una IgE y capaces de unirse a IgE fijadas a los receptores RFc ϵ l de un mastocito o de un basófilo sin disociar dichas IgE de sus receptores, y
20 preferentemente capaces de inducir el entrecruzamiento de las IgE fijadas en los receptores RFc ϵ l de los mastocitos y basófilos.

[0084] El anticuerpo anti-IgE según la invención puede en particular ser un anticuerpo con la capacidad de unirse al receptor CD32, en particular al receptor CD32B, como el que se ha definido anteriormente. El anticuerpo
25 anti-IgE según la invención es un anticuerpo de tipo IgG₁.

[0085] A modo de ejemplo de anticuerpos específicos de IgE murinas, se puede citar la IgG₁K del clon R35-72 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU), la IgG₁K del clon 23G3 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL. Posner et al. (2004) Biochemistry 43: 11352-11360, Keegan et al. (1991) Mol.
30 Immunol. 28: 1149-1154), las IgG_{2a} de los clones E11AC2IIC3, E11BA1ID1, E11BA3ID4, E9AD2IIA5, E11BB5IA6, E5BB3IIA4 y la IgG₁ del clon E5AA1IA6 (Hook et al (1991) Mol. Immunol. 6: 631-639), la IgG_{2a} del clon C12B9 (Keegan et al. (1991) Mol. Immunol. 28: 1149-1154), la IgG_{2a} del clon LO-ME-2 (Kang et al. (2007) Immune Network 7: 141-148) o un fragmento o una forma humanizada de estos.

35 **[0086]** A modo de ejemplo de anticuerpo entrecruzante específico de IgE humanas, se puede citar la IgG₁ del clon E124.2.8 (Beckman Coulter).

[0087] Los anticuerpos pueden, en un modo de realización preferido, ser anticuerpos quiméricos o humanizados derivados del anticuerpo citado anteriormente.
40

[0088] Los anticuerpos anti-IgE según la invención se administran por vía mucosa. De forma preferida ventajosamente, los anticuerpos anti-IgE según la invención se administran por vía sublingual.

Métodos de producción de anticuerpos

45 **[0089]** Los anticuerpos según la invención pueden producirse por medio de cualquier técnica conocida, como por ejemplo, técnicas químicas, biológicas, genéticas, enzimáticas o combinaciones de estas.

[0090] Los anticuerpos quiméricos o humanizados según la invención pueden obtenerse por cualquier medio conocido del experto en la materia, en particular por ingeniería genética de anticuerpos.
50

[0091] La construcción de un anticuerpo quimérico consiste en aislar el ADN codificante de la región VH y la región VL de un anticuerpo monoclonal donante y unirlo al ADN codificante de las regiones CH y CL de una inmunoglobulina humana.
55

[0092] Un anticuerpo humanizado se obtiene sustituyendo las regiones hipervariables de un anticuerpo monoclonal receptor por las regiones hipervariables de un anticuerpo donante («CDR grafting») y puede necesitar eventualmente las siguientes etapas:

i) Diseño del anticuerpo humanizado:

- determinación de las regiones CDRs del anticuerpo donante que tienen que ser transferidas y finalmente, identificación de los residuos de las regiones estructurales del anticuerpo donante que también van a transferirse según sus funciones en el mantenimiento de la estructura de las CDRs, o de sus contribuciones en el punto de unión del antígeno. Dichas regiones o residuos pueden identificarse durante la construcción de un modelo 3D de las regiones variables del anticuerpo y por utilización de programas informáticos como el RASMOL,
- identificación en las bases de datos del anticuerpo humano más apropiado para la humanización y elección del isotipo humano. Por ejemplo, un anticuerpo apropiado para la humanización puede ser un anticuerpo con regiones estructurales cercanas a las del anticuerpo donante.

ii) síntesis de las regiones variables así diseñadas por ejemplo mediante amplificación PCR de las secuencias superpuestas y obtención de los anticuerpos humanizados.

15 **[0093]** El experto en la materia que conoce la composición de aminoácidos de la secuencia deseada es capaz de producir anticuerpos mediante técnicas estandarizadas de producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse en fase sólida, preferentemente usando un aparato de síntesis de péptidos comercializado, como el que fabrica Applied Biosystems, California (EE.UU), y siguiendo las instrucciones del fabricante.

20 **[0094]** Alternativamente, los anticuerpos según la invención pueden producirse por técnicas de ADN recombinante en un sistema de expresión adaptado. El término «sistema de expresión» significa un anfitrión celular y un vector compatible en condiciones apropiadas, es decir, condiciones que permitan la expresión de la proteína codificada por el por el ADN exógeno transportado por el vector e introducido en la célula anfitriona. Típicamente, la secuencia de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo puede insertarse en un vector de expresión apropiado
25 que se introducirá en un anfitrión procariota o eucariota adecuado que producirá el anticuerpo deseado.

[0095] Los términos «vector», «vector de clonado» y «vector de expresión» se refieren a vehículos gracias a los cuales las secuencias de ADN o de ARN codificante del anticuerpo pueden introducirse en una célula anfitriona
30 de forma que la transformen y permita la expresión (es decir la transcripción y la traducción) de la secuencia introducida. Típicamente, un vector de expresión es un plásmido, un cósmido, un episoma, un cromosoma artificial, un fago o un vector viral.

[0096] A título de vectores virales se pueden citar los adenovirus, los retrovirus, los virus del herpes y los
35 vectores derivados del virus adenoasociado (AAV). Dichos virus recombinantes pueden producirse por técnicas conocidas, como la transfección de estirpes celulares que permiten su encapsidación o por transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares de complementación que expresen las funciones necesarias que faltan. Se puede citar por ejemplo, las estirpes celulares que permiten la encapsidación PA317, PsiCRIP, GPenv+, 293, etc. Los protocolos detallados que permiten producir dichos virus recombinantes defectuosos para la multiplicación están
40 disponibles en las solicitudes de patente WO 95/14785, WO 96/22378, US 5,882,877, US 6,013,516, US 4,861,719, US 5,278,056 y WO 94/19478.

[0097] Las células anfitrionas son transfectadas, infectadas o transformadas por un ácido nucleico o un vector apropiado como el que se ha descrito anteriormente. El término de transformación se refiere a la introducción
45 de un gen exógeno (extrínseco o extracelular), de una secuencia de ADN o de ARN en una célula anfitriona de forma que dicha célula anfitriona exprese el gen introducido, la secuencia de ADN o de ARN para producir la sustancia deseada, típicamente la proteína codificada por el gen o la secuencia introducida.

[0098] Los sistemas de expresión habituales incluyen células anfitrionas y vectores plasmídicos de *E. coli*,
50 células anfitrionas de insecto y vectores de tipo Baculovirus y células y vectores de mamíferos.

[0099] Un método de producción a partir de una célula anfitriona que expresa un anticuerpo según la invención puede comprender las etapas que consisten en: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector como el que se ha descrito más arriba en una célula anfitriona competente, (ii) cultivar *in vitro* la célula anfitriona recombinante así obtenida y (iii) por último seleccionar las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo o polipéptido.

[0100] Además, un método de producción del anticuerpo según la invención puede comprender las etapas que consisten en: (i) cultivar la célula transformada descrita anteriormente en condiciones apropiadas para la

expresión del anticuerpo; y (ii) recuperar el anticuerpo así expresado.

[0101] Los anticuerpos pueden separarse del medio de cultivo por métodos convencionales de purificación de las inmunoglobulinas como, por ejemplo, purificación con proteína A-sefara, por cromatografía sobre hidroxilapatita, por electroforesis en gel, por diálisis o por cromatografía de afinidad.

Compuestos terapéuticos

[0102] La presente invención se refiere igualmente a compuestos farmacéuticos para el tratamiento de una hipersensibilidad de tipo 1 por vía mucosa, de forma más preferida por administración por vía sublingual, que comprende un anticuerpo anti-IgE con la capacidad de unir las IgE fijadas a sus receptores a la superficie de un mastocito o basófilo sin disociar dichas IgE de sus receptores y la capacidad de entrecruzar las IgE fijadas a los receptores en la superficie de los mastocitos o basófilos, como se ha definido más arriba.

[0103] Según un modo de realización particular, el compuesto farmacéutico según la invención pueden comprender además un alérgeno como el que se ha definido anteriormente, o un antígeno.

[0104] Los anticuerpos según la invención pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y eventualmente, con matrices de liberación prolongada como, por ejemplo, polímeros biocompatibles para formar compuestos terapéuticos. Dichos polímeros por ejemplo pueden ser polisacáridos como el almidón, las pectinas, las amilopectinas, el quitosano o partículas o partículas polisacáridicas (PSC) como las que se describen en Razafindratsita et al. (2007, J. Allergy Clin Immunol. 120: 278-285) y pueden estar en forma de nanopartículas o de micropartículas.

[0105] Para las terapias combinadas, los compuestos farmacéuticos pueden comprender a la vez los anticuerpos según la invención y un tratamiento de desensibilización específica y/o un tratamiento sintomático de la alergia. A modo de ejemplo de tratamiento de desensibilización específica se puede citar cualquier tratamiento que comporte la administración de extractos alérgicos. Los tratamientos sintomáticos pueden comprender sustancias antiinflamatorias (como corticoesteroides o antihistamínicos), inhibidores de leucotrienos, broncodilatadores, el cromoglicato de sodio, la teofilina.

[0106] El término «farmacéuticamente aceptable» se refiere a moléculas y compuestos que no inducen una reacción adversa, alérgica o no deseada cuando se administran a un mamífero, en particular a un humano. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un semisólido, un líquido, un diluyente, un material encapsulado o cualquier otra formulación.

[0107] La forma del compuesto farmacéutico, el modo de administración, la dosis y la posología pueden depender por supuesto de la enfermedad que se va a tratar, de sus síntomas, de su gravedad, de la edad, del peso y del sexo del paciente.

[0108] El compuesto farmacéutico o terapéutico según la invención está formulado de forma que puede administrarse por vía mucosa, sublingual, oral, nasal, vaginal, rectal, bronquial, auricular, conjuntiva. Preferentemente, el compuesto farmacéutico o terapéutico se administra por vía sublingual, oral, nasal, vaginal, rectal, bronquial, auricular, o conjuntiva. De forma preferida, el compuesto farmacéutico o terapéutico se administra por vía mucosa, en particular por vía bucal, sublingual, nasal, oral, bronquial, rectal, vaginal o auricular. De forma preferida sobre las demás, el compuesto farmacéutico o terapéutico se administra por vía sublingual.

[0109] Los compuestos farmacéuticos según la invención pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para poder ser inyectados (en particular éstos pueden ser soluciones salinas isotónicas y estériles, fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, o una mezcla de dichas sales). Dichos compuestos pueden ser igualmente compuestos secos, en particular compuestos secos y congelados, liofilizados o refrigerados, que, tras adición, según el caso, de agua estéril o de agua fisiológica, constituyen soluciones inyectables.

[0110] Las dosis utilizadas pueden adaptarse en función de diferentes parámetros, como, en particular, el modo de administración, el tipo de patología o alternatively, la duración del tratamiento considerado. Preferentemente la dosis se adapta para permitir un tratamiento en una sola vez por monodosis.

[0111] Para preparar los compuestos farmacéuticos, se puede disolver o dispersar una cantidad suficiente de

anticuerpos en un vehículo farmacéuticamente aceptable o en un medio acuoso.

- [0112]** Las formas farmacéuticas apropiadas para un uso por inyección comprenden las soluciones de agua estéril, las dispersiones, las formulaciones que incluyen el aceite de sésamo, o el propilenglicol acuoso, así como los
5 polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma utilizada debe ser estéril y debe ser lo suficientemente fluida como para poder inyectarla fácilmente con una jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de producción y de almacenamiento y estar protegida de las contaminaciones por microorganismos, como las bacterias o los hongos.
- [0113]** Las soluciones de los compuestos activos, estén en forma libre o como sales aceptables desde un punto de vista farmacéutico, pueden prepararse con agua mezclada con un tensioactivo como la hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden hacerse en glicerol, en polietilenglicoles líquidos, en una mezcla de los dos o en aceites. Estas preparaciones generalmente contienen un agente conservador para impedir el crecimiento de microorganismos en condiciones normales de almacenamiento y de uso.
- [0114]** Tras su formulación en forma de medicamento, las soluciones pueden administrarse de un modo compatible con la dosis de la formulación y en una cantidad terapéuticamente activa. Los medicamentos pueden ser administrados como se ha descrito anteriormente, pero también en forma de cápsulas que los liberen.
- [0115]** Se prefiere particularmente la administración por vía sublingual. En una administración sublingual, el compuesto farmacéutico alcanza las células de la mucosa y finalmente las células de la submucosa. Dicho modo de administración tiene la ventaja de ser sencillo, rápido y de evitar el paso por el tracto gastrointestinal donde el compuesto farmacéutico corre el riesgo de que las enzimas digestivas lo degraden. Un compuesto farmacéutico para administración por vía sublingual puede estar formulado preferentemente en forma de gotas (que pueden contener
25 glicerol) o comprimidos.
- [0116]** Preferentemente, cuando los anticuerpos y/o los compuestos farmacéuticos según la invención se administran por vía mucosa, en particular por vía sublingual, no son directamente accesible a los receptores DC-SIGN. Por «DC-SIGN» (en inglés «Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin»),
30 o «CD209», se entiende aquí una lectina de tipo C con una alta afinidad para el ácido siálico.
- [0117]** Las inmunoglobulinas según la invención pueden añadirse a una mezcla terapéutica en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 1000 miligramos o aproximadamente 0,01 a 500 miligramos o aproximadamente 1 a 200 miligramos, aproximadamente 10 a 100 miligramos por dosis, preferentemente del orden de 100 miligramos.
35 Asimismo pueden administrarse dosis múltiples.
- [0118]** De forma preferida, la inmunoglobulina según la invención se administra con una concentración subóptima, es decir con una concentración insuficiente para inducir la desgranulación de los mastocitos o basófilos. El experto en la materia puede determinar fácilmente la concentración subóptima de un anticuerpo según la
40 invención. Por ejemplo, puede analizar el efecto de diferentes concentraciones de anticuerpos sobre mastocitos y basófilos. La concentración subóptima corresponderá a todas las concentraciones inferiores a la concentración mínima (concentración óptima) que inducen la desgranulación. Preferentemente, la concentración subóptima se determina durante ensayos clínicos en personas o animales.
- [0119]** Se aceptan otras formas farmacéuticas que incluyen por ejemplo los comprimidos u otras formas sólidas de administración, cápsulas de liberación retardada o cualquier otra forma utilizable.
- [0120]** En ciertos modos de realización de la invención, el uso de liposomas y/o de micropartículas y/o de nanopartículas puede plantearse para introducir anticuerpos en el anfitrión. El experto en la materia conoce el uso y
50 la formación de liposomas y/o de micropartículas y/o de nanopartículas.

Aplicaciones terapéuticas

- [0121]** La solicitud describe inmunoglobulinas utilizadas para tratar enfermedades y manifestaciones
55 inflamatorias.
- [0122]** Por «enfermedad inflamatoria» se entiende aquí una enfermedad asociada a una inflamación. El experto en la materia conocerá ejemplos de enfermedades inflamatorias que incluyen en particular el asma, las hipersensibilidades, las alergias.

[0123] Las «manifestaciones inflamatorias» designan reacciones inflamatorias que se producen durante enfermedades que no son propiamente dichas inflamatorias, como las parasitosis o las mastocitosis.

5 **[0124]** Las inmunoglobulinas que tienen la capacidad de unir las IgE a la superficie de los mastocitos o basófilos sin disociar dichas IgE de sus receptores y de entrecruzar las IgE fijadas a los receptores en la superficie de los mastocitos o basófilos para su uso según la invención, y los compuestos o los medicamentos que las comprenden se utilizan para tratar las alergias inmediatas.

10 **[0125]** El término «alergia inmediata» o «hipersensibilidad de tipo I», tal y como se utiliza aquí, significa una respuesta humoral en respuesta a un alérgeno que se diferencia de una respuesta humoral normal por el hecho de que los plasmocitos secretan IgE.

[0126] Entre las manifestaciones clínicas debidas a las alergias inmediatas que se pueden tratar con el anticuerpo según la invención se pueden citar, a título de ejemplo, la anafilaxia sistémica, la anafilaxia localizada (atopia), la rinitis alérgica, el asma, las alergias alimentarias, la dermatitis atópica, la conjuntivitis, el eccema, la mastocitosis inducida por un choque anafiláctico, las manifestaciones alérgicas causadas por las IgE secretadas como respuesta a una infección por un parásito. De forma particularmente preferida, en el marco de la invención, las alergias inmediatas se manifiestan a través del asma.

20 **[0127]** En el marco de la invención la alergia puede estar causada por la exposición de un individuo a cualquier alérgeno.

[0128] Algunos ejemplos de alérgenos pueden ser, a título no limitativo, alérgenos de polen (de árboles, de gramíneas, etc.), alérgenos de ácaros (polvo doméstico o de almacenamiento), alérgenos de insecto (de himenópteros, de cucarachas, etc.), alérgenos de animales (de perro, de gato, de caballo, de rata, de ratón, etc.), alérgenos de enmohecimiento y alérgenos alimentarios.

[0129] Por ejemplo, el alérgeno puede seleccionarse en el grupo que consiste en las proteínas alérgenas del género *Dermatophagoides*, las proteínas alérgenas del género *Felis*, las proteínas alérgenas del género *Ambrosia*, las proteínas alérgenas del género *Lolium*, las proteínas alérgenas del género *Cryptomeria*, las proteínas alérgenas del género *Alternaria*, las proteínas alérgenas del género *Alder*, las proteínas alérgenas del género *Betula*, las proteínas alérgenas del género *Blomia*, las proteínas alérgenas del género *Quercus*, las proteínas alérgenas del género *Olea*, las proteínas alérgenas del género *Artemisia*, las proteínas alérgenas del género *Plantago*, las proteínas alérgenas del género *Parietaria*, las proteínas alérgenas del género *Canis*, las proteínas alérgenas del género *Blattella*, las proteínas alérgenas del género *Apis*, las proteínas alérgenas del género *Cupressus*, las proteínas alérgenas del género *Thuja*, las proteínas alérgenas del género *Chamaecyparis*, las proteínas alérgenas del género *Periplaneta*, las proteínas alérgenas del género *Agropyron*, las proteínas alérgenas del género *Secale*, las proteínas alérgenas del género *Triticum*, las proteínas alérgenas del género *Cynorhodon*, las proteínas alérgenas del género *Juniperus*, las proteínas alérgenas del género *Dactylis*, las proteínas alérgenas del género *Festuca*, las proteínas alérgenas del género *Poa*, las proteínas alérgenas del género *Avena*, las proteínas alérgenas del género *Holcus*, las proteínas alérgenas del género *Anthoxanthum*, las proteínas alérgenas del género *Arrhenatherum*, las proteínas alérgenas del género *Agrostis*, las proteínas alérgenas del género *Phleum*, las proteínas alérgenas del género *Phalaris*, las proteínas alérgenas del género *Paspalum*, las proteínas alérgenas del género *Sorghum*.
 Algunos ejemplos de proteínas alérgenas conocidas derivadas de proteínas de géneros enumerados anteriormente incluyen: *Cynorhodon* Cyn d 1; *Dermatophagoides* (*pteronyssinus* o *farinae*) Der p 1; Der p 2; Der p 3; Der p 5; Der p 7; Der f 1; Der f 2; Der f 3; Der f 5; Der f 7; *Felis* (*domesticus*) Fel d 1; *Ambrosia* (*artemisiifolia*) Amb a 1; Amb a 2; Amb a 3; Amb a 4; *Lolium* (*perenne*) Lol p 1; Lol p 2; Lol p 3; Lol p 4; Lol p 5; Lol p 9; *Cryptomeria* (*japonica*) Cry j 1; Cry j 2; *Juniperus* (*sabinoide*s o *virginiana*) Jun s 1; Jun v 1; *Juniperus* (*ashei*) Jun a 1; Jun a 2; *Dactylis* (*glomerata*) Dac g 1; Dac g 5; *Poa* (*pratensis*) Poa p 1; Poa p 5; *Phleum* (*pratense*) Phl p 1; Phl p 5; *Anthoxanthum* (*odoratum*) Ant o 1; Ant o 5; *Betula* (*verrucosa*) Bet v 1; Bet v 2; Bet v 4 y *Sorghum* (*halepensis*) Sor h 1.

[0130] Los alérgenos alimentarios pueden provenir de la leche, huevos, legumbres (como el cacahuete y la soja), nueces y avellanas, trigo, crustáceos, pescados y moluscos y sus productos derivados. En particular, los alérgenos alimentarios pueden ser la ovoalbúmina o el gluten.

[0131] En el contexto de la invención, el término «tratar» o «tratamiento» significa suprimir, aliviar o impedir la progresión de un trastorno o evitar la aparición de dicho trastorno o de uno o varios síntomas relacionados con ese trastorno. En particular, el tratamiento de las alergias inmediatas puede consistir en reducir o incluso

preferiblemente en suprimir la inflamación excesiva debida a la liberación por los mastocitos y basófilos de moléculas proinflamatorias mediante la administración de una cantidad terapéuticamente activa de anticuerpos según la invención.

- 5 **[0132]** El término «paciente» o «individuo» según la invención se utiliza para designar un humano o un mamífero no humano (como por ejemplo un roedor (ratón, rata), un félido, un cánido o un primate) que desarrolle o sea susceptible de desarrollar una alergia inmediata. Preferentemente, el sujeto es un humano.

- 10 **[0133]** El término «cantidad terapéuticamente activa» significa una cantidad de anticuerpo suficiente para tratar una alergia inmediata y que tenga una relación beneficio/riesgo aceptable para un tratamiento farmacológico. La cantidad de anticuerpos y de compuestos según la invención así como la frecuencia de administración será determinada por estudios clínicos, por el médico o por el farmacéutico. La dosis «terapéuticamente activa» específica para cada uno de los pacientes podrá depender de un cierto número de factores como la naturaleza y la gravedad del trastorno que se va a tratar, la actividad del anticuerpo utilizado, el compuesto utilizado, la edad, el peso, el estado general de salud, el sexo y el régimen del paciente, el modo de administración, la duración del tratamiento (en monodosis o en varias dosis), los medicamentos utilizados en combinación y otros factores que los especialistas médicos conocen.

- 20 **[0134]** La invención también está descrita en las figuras y ejemplos siguientes, que no tienen carácter limitativo.

FIGURAS

- 25 **[0135]**
- La Figura 1 representa el efecto, sobre la hiperreactividad bronquial (medida en valor Penh o «enhanced pause»), de la estimulación con metacolina de un grupo de tres ratones BALB/c no sensibilizados con ovoalbúmina (grupo 1) y de grupos de cinco ratones tras sensibilización con ovoalbúmina y desensibilización con:
- 30 - grupo 2: PBS;
- grupo 3: ovoalbúmina a razón de 500 mg por administración sublingual, dos veces por semana, durante dos meses;
- grupo 4: el isotipo de control de rata de tipo IgG₁k a razón de 25 µg por administración sublingual, dos veces por semana, durante dos meses;
- 35 - grupo 5: el anticuerpo de rata anti-IgE de ratón de clon R35-72 a razón de 25 µg por administración sublingual, dos veces por semana, durante dos meses;
- grupo 6: el anticuerpo de rata anti-IgE de ratón de clon R35-72 a razón de 10 µg por administración sublingual, dos veces por semana, durante dos meses.
- 40 La Figura 2 muestra la reactividad de las vías respiratorias por medición del valor Penh en respuesta a una administración de metacolina (100 mg/ml). Se han analizado ocho ratones en cada grupo. Las barras horizontales representan la respuesta media en cada grupo, cada punto representa el valor Penh obtenido para un animal en concreto. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.
- 45 La Figura 3 muestra el recuento de macrófagos y eosinófilos en los lavados broncoalveolares de los ratones que reciben diversos tratamientos. Los resultados se representan en forma de media ± error estándar de la media. N = 8 ratones por grupo. * p< 0,05 en comparación con ratones desensibilizados con PBS (placebo). Los datos se han comparado utilizando la prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis).

50 **EJEMPLO 1:**

Materiales y métodos

Sensibilización y desensibilización de los ratones.

- 55 **[0136]** Se han sensibilizado ratones BALB/c con ovoalbúmina (OVA) como se describe en Razafindratsita et al. (2007, J. Allergy Clin. Immunol. 120: 278-285).

[0137] A continuación se han tratado por vía sublingual grupos de 5 ratones, dos veces por semana, durante

dos meses con:

- 500 µg de OVA por administración;
- 10 o 25 µg de IgG₁K de rata anti-IgE de ratón (clon R35-72; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) por administración;
- 25 µg de IgG₁K de rata no específica (isotipo de control; eBioscience, San Diego, CA, USA) por administración o
- PBS para el grupo de ratones testigo.

[0138] Se somete a los ratones a una provocación alérgica con los aerosoles de OVA (1 % masa/volumen), dos veces durante dos días consecutivos.

[0139] Paralelamente, se utiliza un grupo de tres ratones sanos no sometidos a la ovoalbúmina como grupo testigo.

[0140] El anti-IgE utilizado, del clon R35-72, es un anticuerpo de rata de tipo IgG₁K conocido por su capacidad para unirse a las IgE en la superficie de los mastocitos y/o basófilos e inducir así la liberación por dichas células de mediadores proinflamatorios (Kubo et al. (2003) J. Immunol. 170: 775-780, Zhou et al. (2007) J. Exp. Med. 204: 2797-2802).

[0141] El anticuerpo monoclonal IgG₁K de rata no específico no tiene especificidad para las IgE murinas.

Determinación de la hiperreactividad bronquial.

[0142] La medición de la hiperreactividad bronquial se efectúa 24 horas después de la última provocación por una pletismografía de cuerpo entero (Buxco Europe Ltd, Winchester, UK) como se describe en Hamelmann et al. (1997, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156: 766-775) y se estima la resistencia bronquial por medición del PenH (enhanced pause). El índice de PenH se ha obtenido por determinación de la relación entre los valores de PenH medidos tras exposición a una inhalación de metacolina USA y tras exposición a PBS nebulizado.

30 Resultados

[0143] Para determinar el efecto de un anticuerpo anti-IgE que tenga la capacidad de unir y de entrecruzar las IgE murinas a la superficie de mastocitos y basófilos sobre la respuesta alérgica, se han sensibilizado ratones con ovoalbúmina y después se han desensibilizado con dicho anticuerpo anti-IgE. Se comparan estos ratones con ratones sensibilizados con ovoalbúmina y después desensibilizados con la misma ovoalbúmina, o desensibilizados con un isotipo de control, o no desensibilizados. Todos estos ratones se comparan con ratones no sensibilizados con ovoalbúmina.

[0144] La hiperreactividad bronquial con la metacolina aumenta en los ratones sensibilizados con ovoalbúmina y tratados con PBS (FIG. 1, grupo 2), según traduce el valor elevado del parámetro «PenH» en comparación con el valor obtenido para los ratones no sensibilizados con ovoalbúmina (FIG. 1, grupo 1).

[0145] Se observa una mejora de la hiperreactividad bronquial en los ratones sensibilizados y después desensibilizados con ovoalbúmina (FIG. 1, grupo 3).

[0146] Se observa una mejora aún más importante de la hiperreactividad bronquial en los ratones sensibilizados con ovoalbúmina y después desensibilizados con, por orden creciente de mejora:

- el anti-IgE a razón de 10 µg por administración (FIG. 1, grupo 6);
- el isotipo de control a razón de 25 µg por administración (FIG. 1, grupo 4);
- el anti-IgE a razón de 25 µg por administración (FIG. 1, grupo 5).

[0147] Este ejemplo muestra de forma muy sorprendente que la administración de un anticuerpo anti-IgE que tenga la capacidad de unirse a las IgE a la superficie de los mastocitos y basófilos sin disociar dichas IgE de sus receptores permite inducir una disminución muy sustancial de la hiperreactividad bronquial de los ratones sensibilizados con la ovoalbúmina.

[0148] Dicha disminución depende de la cantidad de anti-IgE administrada y es mucho más eficaz que una desensibilización con ovoalbúmina gracias a las concentraciones molares al menos 60 veces inferiores (sabiendo

que las masas moleculares de la ovoalbúmina y de una inmunoglobulina son respectivamente de 45 kDa (Nisbet et al. (1981) Eur. J. Biochem. 115: 335-345) y de 150 kDa aproximadamente.

[0149] Al menos una parte del efecto está relacionada con la especificidad de los anti-IgE, como indica la diferencia del valor Penh observado en 25 µg por administración entre el anti-IgE y el isotipo de control, que es del mismo orden que la diferencia observada entre el alérgeno (ovoalbúmina) y el placebo (PBS). El efecto obtenido con el isotipo de control puede eventualmente ser explicado por la inducción de señales no específicas que reduzcan la reacción anafiláctica durante la fijación de dicho anticuerpo al receptor en IgG inhibidor, el RFcγIIb (Kang et al. (2007) Immune Network 7: 141-148).

EJEMPLO 2:

[0150] El presente estudio muestra el efecto del anticuerpo anti-IgE de entrecruzante o no entrecruzante así como del anticuerpo de tipo IgG₁ administrados por vía sublingual en inmunoterapia utilizando un modelo murino *in vivo* de asma alérgico.

Material y métodos

Ratones, reactivos y anticuerpos

[0151] Se han conseguido ratones hembra de entre 6 y 8 semanas de edad, de Charles River (L'Arbresle, Francia). La solución salina amortiguada con fosfato (PBS) proviene de Invitrogen (Carlsbad, CA). La ovoalbúmina (OVA) nivel V con un bajo contenido en endotoxina se ha conseguido en Sigma (St. Louis, MO) y además se ha purificado con un gel que elimina las endotoxinas (Pierce, Rockford, IL). Las concentraciones de endotoxina residual, determinadas por análisis con Endochromo K (R1708K, Charles River, Wilmington, MA) siempre eran inferiores a 0,1 unidad enzimática (UE)/µg de proteína. Una forma polimerizada de maltodextrina de maíz (polisacárido capsular o PSC) se ha utilizado como sistema de administración de antígeno particular mucoadhesivo (Baudner et al. (2002) Infect. Immun. 70:4785-4790; Razafindratsita et al. (2007) J. Allergy Clin. Immunol. 120:278-285)

[0152] Los anticuerpos monoclonales (mAB) citados en la tabla 1 se han utilizado como anticuerpos purificados para una administración sublingual.

Tabla 1: Lista de anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Antígeno	Especie/Isotipo	Fabricante
LO-ME-2	IgE (entrecruzante)	Rata IgG _{2a} /k	Invitrogen, ref: 04-7000
Isotipo de control	IgE	Rata IgG _{2a}	e-biosciences, ref: 14-4321
R35-92	IgE (no entrecruzante)	Rata IgG ₁ /k	BD Biosciences, ref: 553416
R35-72	IgE (entrecruzante)	Rata IgG ₁ /k	BD Biosciences, ref: 553413
Isotipo de control	IgE	Rata IgG ₁ /k	e-biosciences, ref: 14-4301

Purificación de los anticuerpos

[0153] Para obtener todos los anticuerpos en una solución amortiguadora idéntica, las muestras de anti-IgE se han dializado contra 10 volúmenes de PBS, utilizando membranas de 30 kD (Amicon Ultra-4, Millipore Corp.). Además las muestras desaladas se han filtrado (Millex 0,22 µm, Millipore Corp.) para impedir cualquier crecimiento bacteriano en ausencia de aziduro de sodio. Por último, se han determinado las concentraciones protéicas utilizando la densidad óptica a 280 nm (OD280) (Secoman XL, Uvikon) antes y después del filtrado.

Inmunoterapia sublingual en los ratones BALB/c

[0154] Para la sensibilización, se han inmunizado ratones por vía intraperitoneal (i.p.) los días 0 y 14 con 10 µg de OVA adsorbidos en 2 mg de Al(OH)₃, administrados en 100 ml de PBS. El día 21, se ha realizado una prueba de provocación de 20 min por aerosol con un 1 % (peso/volumen) de OVA durante 4 días consecutivos utilizando un sistema de administración de aerosol (Buxco Europe Ltd, Winchester, UK). Para la inducción de la tolerancia, se han aplicado los anticuerpos anti-IgE (10 mg y 25 mg por dosis) por vía sublingual a grupos de 8 ratones, dos veces por semana durante 2 meses. Los ratones testigos se han tratado por vía sublingual con PBS o anticuerpo isotípico

(IgG₁/k e IgG_{2a}). Como control positivo de la eficacia, se han tratado ratones por vía sublingual con PSC-OVA (500 µg). Se han realizado mediciones de hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) por pletismografía de cuerpo entero (Puxco Europe Ltd, Winchester, UK) y los resultados se han expresado con pausa mejorada («enhanced pause» o Penh). El índice Penh, expresado como un aumento respecto de la resistencia basal de las vías respiratorias, se ha obtenido dividiendo el valor Penh medido tras exposición por inhalación a dosis crecientes de metacolina (de 0 a 100 mg) entre el valor Penh medido tras inhalación de PBS nebulizado, como se describe en Razafindratsita et al. 2007).

[0155] Para el análisis de las células inflamatorias en los lavados broncoalveolares (BAL), los ratones se han anestesiado por inyección intraperitoneal de pentobarbital (50 mg/kg de masa corporal), y se han realizado los BAL con 3 x 400 µl de PBS. El fluido de los BAL se ha centrifugado a 800 g durante 10 min a 4°C. Los residuos celulares se han resuspendido en PBS, puesto a girar en láminas de cristal por citocentrifugado, fijado y marcado con May/Grünwald Giema (Réactifs RAL, Martillac, Francia). Los eosinófilos y los macrófagos se han contado con un microscopio óptico utilizando un aumento de 200 veces.

15 Respuesta anticuerpos

[0156] Se han recogido muestras de sangre en el seno retroorbital para evaluar los niveles de anticuerpos específicos de OVA por ELISA. Se han recogido los sueros después de centrifugarlos a 10000 rpm durante 10 min. Para la detección de los anticuerpos IgG₁ e IgG_{2a}, se ha extendido OVA purificada (0,2 µg) durante la noche a 4°C sobre placas ELISA (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Después de las etapas de lavado y de saturación, se han incubado sueros de ratón (1/100 a 1/12800 para IgG₁ y 120 a 1/12560 para IgG_{2a}) durante 1 h a 37°C. Se han lavado las placas y se han añadido IgG₁ de rata biotiniladas antirratón (dilución 1/100, BD Pharmingen, San Jose, CA) o anticuerpos IgG_{2a} (dilución 1/200, BD Pharmingen) durante 1 h a 37°C. Para la detección se han utilizado anticuerpos IgG de rata antirratón conjugados con estreptavidina-peroxidasa (dilución 1/400, BD Pharmingen), utilizando ortofenilenediamina (OPD) como sustrato (Sigma Chemicals Aldrich). La reacción se ha detenido con HCl 3N y las densidades ópticas se han determinado utilizando un lector de placas ELISA a 492 nm (Labsystems, Helsinki, Finlandia).

[0157] Para la detección de los títulos de anticuerpos IgE, se han extendido anticuerpos IgE antirratón (1 mg/pocillo, Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas) sobre placas ELISA. Después de las etapas de lavado y de saturación, se han incubado las diluciones de suero de ratón (1/10 a 1/320) durante 1 h a 37°C. Se ha incubado digoxigenina-OVA (a una dilución 1/10) durante 1 h a 37°C y se han utilizado fragmentos Fab de anticuerpos de ratones antidigoxigenina conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Roche) para la detección a una dilución de 1/1000. Se ha añadido un sustrato ácido 2,2'azino-bis(3-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) (ABTS) (Roche). Se han determinado las densidades ópticas utilizando un lector de placas ELISA a 405 nm.

[0158] Los títulos de anticuerpos se han definido como la inversa de la última dilución en la que el valor de la densidad óptica está 2 veces por encima del ruido de fondo.

[0159] Para determinar los niveles de anticuerpos específicos del alérgeno en las superficies mucosas, se han recogido muestras de saliva para hacer una determinación del nivel de IgA mediante ELISA. Brevemente, las microplacas se han recubierto con IgA de cabra antirratón (0,1 mg/pocillo, Bethyl Laboratories), lavado, y se han incubado diluciones del sobrenadante (1/20 a 1/320) durante 1 h a 37°C, seguido por dioxigenina-OVA (dilución 1/100). Se han lavado las placas y se han utilizado anticuerpos de conejo anti-digoxigenina conjugados con HRP (Roche) para la detección, como se ha descrito más arriba.

Análisis estadístico

[0160] Los datos se han comparado utilizando la prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis). Los resultados se han considerado como estadísticamente significativos con un valor p inferior a 0,05.

Resultados:

55 *Los anti-IgE de los clones R35-72 y R35-92 así como los isotipos IgG₁/k correspondientes mejoran la eficacia clínica en ratones sensibilizados específicamente con OVA y en la inflamación pulmonar.*

[0161] Como se ha descrito más arriba, los ratones sensibilizados con OVA desarrollan una hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) asociada a valores Penh elevados detectables por pletismografía de cuerpo entero,

así como signos de inflamación de los pulmones con infiltraciones celulares. Se han probado anticuerpos anti-IgE (clones LO-ME-2, R35-72 y R35-92) como candidatos para la inmunoterapia en este modelo murino *in vivo* de asma estable. Se han utilizado anticuerpos del isotipo correspondiente y PSC-OVA como controles en estos experimentos.

5 **[0162]** Como se muestra en la **Fig. 2**, y como se esperaba, los ratones sanos (es decir, no sensibilizados) presentaban valores Penh bajos mientras que los ratones sensibilizados con OVA tratados por vía sublingual con PBS (placebo) presentaban una AHR elevada. Los ratones sensibilizados con OVA tratados por vía sublingual con PSC-OVA se han utilizado como control positivo y mostraban valores Penh bajos. Un tratamiento sublingual con el control isotípico IgG_{2a}/k o con anticuerpos anti-IgE (isotipo IgG_{2a}/k) del clon LO-ME-2 (10 o 25 µg) no ha tenido
10 impacto en la AHR. Al contrario, un tratamiento sublingual con anti-IgE (isotipo IgG₁) de los clones R35-72 y R35-92 ha inducido una reducción de la AHR en la mayoría de los animales frente a los ratones tratados con PBS. De forma sorprendente, el control isotípico IgG₁ ha inducido una reducción similar de la AHR, sugiriendo que los mecanismos inmunitarios no específicos del antígeno están implicados en la inducción de la tolerancia en este modelo.

15 **[0163]** La disminución de la AHR observada tras el tratamiento con los anti-IgE correspondientes a los clones R35-72 y R35-92 (10 o 25 µg) y el control isotípico IgG₁ correspondiente se ha asociado a una disminución significativa ($p < 0,05$) del número de eosinófilos en los BAL, como se ha observado con el control positivo PSC-OVA (**Fig. 3**).

20 *La administración sublingual terapéutica de anticuerpo anti-IgE no altera las respuestas IgG, IgE o IgA.*

[0164] La inmunoterapia sublingual (SLIT) con los anticuerpos anti-IgE del clon LO-ME-2 (isotipo IgG_{2a}/k) ha aumentado las IgG₁ e IgE específicas de OVA solamente en la dosis de 10 µg. En todos los demás grupos experimentales no se ha producido un cambio detectable en el anticuerpo séricos IgE o IgG específicos de OVA. Los
25 niveles de anticuerpos salivares IgA específicos de OVA aumentaban en los ratones tratados con PSC-OVA frente a los ratones que recibieron PBS. En cambio, ninguno de los anticuerpos anti-IgE ni los anticuerpos de control con los isotipos correspondientes han alterado el nivel de anticuerpos IgA específicos de OVA.

[0165] Así este estudio muestra que los anticuerpos anti-IgE de isotipo IgG₁/k de los clones R35-72 y R35-92
30 permiten aumentar la inducción de la tolerancia. Además, los anticuerpos de control isotípicos IgG₁/k promueven igualmente la inducción de la tolerancia. Al contrario, los anticuerpos anti-IgE de isotipo IgG_{2a}/k del clon LO-ME-2 y los anticuerpos de control isotípicos IgG_{2a}/k no alteran la función pulmonar en los ratones sensibilizados con OVA. Así estos datos sugieren que el efecto inductor de tolerancia de los anticuerpos anti-IgE de los clones R35-72 o R35-92 podría implicar la región Fc de los isotipos IgG₁/k. Esto desvela la posibilidad de que dichos anticuerpos anti-IgE
35 podrían mediar su efecto inductor de tolerancia uniéndose a la vez a las IgE unidas a FcεR1 por sus regiones Fab, y uniéndose al receptor regulador FcγRIIb, a través de su región Fc.

EJEMPLO 3

40 **[0166]** Este estudio muestra la distribución de los receptores Fc de las IgG en los tejidos linguales del ratón y la caracterización de la N-glicosilación de las regiones Fc de los anticuerpos utilizados en el ejemplo 2.

Material y métodos

45 *Inmunohistología*

[0167] Para la inmunohistología, se han extraído tejidos del bazo y de la lengua de ratones no sometidos a tratamiento y congelados a -80°C. Se han cortado en serie secciones de tejidos (4-6 mm de longitud), secado al aire durante al menos 30 min, fijado en acetona durante 1-2 minutos, e incubado durante 10 min en 3 % de peróxido de
50 hidrógeno (Sigma) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Tras lavado en solución amortiguadora Tris (TBS: 0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4), se han añadido los anticuerpos primarios es decir anti-CD16/32 (clon 2.4G2, BD Biosciences) o anti-SIGN-R1 (clon ERTRP9, Abcam) (dilución 1/100 en TBS) a las muestras y se han incubado durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones de tejido se han lavado en TBS y se han incubado con anticuerpos secundarios IgG de conejo anticaprino biotinilados (Sigma 1/400) durante 30 min antes de añadir
55 peroxidasa de rábano picante biotina-estreptavidina (SA-HRP, Sigma). Pasados 30 min, se han lavado las muestras y se ha visualizado el marcado específico utilizando la diaminobencidina (DAB, Sigma) como sustrato. Se han incluido secciones de tejido realizadas en ausencia del anticuerpo primario como controles negativos.

Análisis de la N-glicosilación de los anticuerpos utilizando LC-ESIMS

[0168] Los anticuerpos IgG de rata anti-IgE (R35-72 y R35-92 de BD Biosciences, eBRG1 y eBR2 de eBiosciences, LOME2 de Invitrogen) se han desnaturalizado (urea 6 M) y reducido (75 mM DTT, 50°C, 15 min) antes del análisis por LC-ESIMS. El análisis de cadenas pesadas reducidas por ESIMS se ha hecho después de la separación cromatográfica de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas. Las IgG también se han sometido a la LC-ESIMS tras deglicosilación (tratamiento PNGase F, Glycoprofile II, Sigma) o eliminación enzimática del ácido siálico (sialidasa Au, QA Bio) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se han inyectado 2 mg aproximadamente de anticuerpo reducido en una Acquity C4, cm x 2,1 mm, 1,7 mm (BEH300, Waters) termostada a 80°C y conectada a un sistema RS-HPLC (Dionex). Se ha hecho un gradiente de CH₃CN (con 0,1% v/v de ácido fórmico) a una velocidad de flujo de 400 ml/min para asegurar una detección UV correcta a 210 nm. Un espectrómetro de masa Qq-TOF (Maxis, Bruker) estaba conectado al RS-HPLC para una medición de masa correcta y operaba en modo de ionización positiva. La deconvolución del espectro de masa se ha realizado utilizando el algoritmo MaxEnt (Waters Corp.) utilizando los siguientes parámetros: 45000-55000 Da, autoespaciado de los puntos de datos, resolución 40000. Así, se han obtenido las masas de cadenas pesadas intactas, desialiladas y deglicosiladas para identificar los perfiles de glicosilación.

Resultados:

Identificación de las células que transportan los receptores Fc de las IgG en los tejidos de la lengua de los ratones BALB/c no sometidos a tratamiento y sensibilizados con OVA

[0169] Para determinar la distribución del tejido del receptor Fc de las IgG, los inventores han analizado los tejidos linguales de ratón BALB/c no sometidos a tratamiento y sensibilizados con OVA por inmunohistología utilizando anticuerpos específicos es decir CD16/CD32 y SIGN-R1. CD16/CD32 se ha detectado en la interfaz mucosa/submucosa a la vez en puntos de tejido ventral y dorsal de la lengua así como en la zona muscular, a la vez en los ratones no sometidos a tratamiento y los ratones sensibilizados con OVA. En cambio, SIGN-R1 solo se ha detectado en el tejido muscular (tanto en los ratones no sometidos a tratamiento como en los sensibilizados con OVA), lejos del punto de administración sublingual.

Análisis de la N-glicosilación de los anticuerpos por LC-ESIMS

[0170] Las IgG se han desnaturalizado y reducido antes del análisis por LC-ESIMS de las cadenas pesadas intactas, desialiladas y deglicosiladas, para identificar sus perfiles de glicosilación respectivos.

[0171] Las diferentes estructuras oligosacáridicas han sido determinadas por LC-ESIMS, a la vez antes y después de las digestiones enzimáticas (es decir desglicosilación y eliminación del ácido siálico). El anticuerpo R35-92 presentaba una heterogeneidad estructural de las glicofomas de cadenas pesadas, con la adición sucesiva de diferentes monosacáridos con oligosacárido unido en N. El espectro de masa del anticuerpo R35-92 desglicolizado muestra la masa (49075 Da) del polipéptido de la cadena pesada mientras que el espectro de masa de la cadena pesada nativa muestra un aumento de masa de 1298 Da correspondiente a la adición de una estructura no fucosilada, no galactosilada, no sialilada, biantenaria (masa observada 50373 Da). También se han destacado polisacáridos biantenarios sialilados, galactosilados y fucosilados. El tratamiento con sialidasa ha confirmado la presencia de estructuras biantenarias fucosiladas a la vez mono y bisialiladas. Se han realizado experimentos similares en cada anticuerpo. Los resultados están resumidos en la tabla 2 que aparece a continuación.

Tabla 2: Resumen de la caracterización de la N-glicosilación de las cadenas pesadas

Clon	Isotipo	Actividad	Sialilación	Fucosilación
R35-72	IgG ₁	+	ND	40%
R35-92	IgG ₁	+	30%	50%
eBRG1	IgG ₁	+	ND	ND
eBRG2	IgG _{2a}	-	ND	100%
LO-ME*	IgG _{2a}	-	ND	50%
ND: no detectado *: el anticuerpo LO-ME presenta un perfil de espectro de masa no habitual				

[0172] Según la RS-HPLC seguida del análisis ESIMS de alta resolución y de alta precisión, todos los anticuerpos monoclonales IgG de rata anti-IgE analizados (R35-72, R35-92, eBRG1, eBRG2 y LO-ME2) presentan

5 cadenas pesadas N-glicosiladas. Se han observado estructuras oligosacáridicas regulares, la mayoría biantenarias no galactosiladas. La glicosilación es diferente entre los anticuerpos porque una sialización significativa (aproximadamente 30 %) solo se ha observado en la muestra R35-92. Además, también se ha comprobado la ausencia de fucosa corazón (muestra eBRG1) y una fucosilación parcial o total (muestras R35-92 y eBRG2 respectivamente). Así, ni la sialización ni la fucosilación tienen una función crítica en lo que respecta a la actividad de inducción de la tolerancia.

EJEMPLO 4

- 10 **[0173]** Este estudio presenta la identificación de los receptores del fragmento Fc de las IgG₁ en los tejidos bucales humanos.
- 15 **[0174]** Los anticuerpos anti-CD32 (clon AT10, ref ab41899, Abcam) reconocen la familia de los receptores inhibidores CD32.
- [0175]** La presencia de células que expresan CD32 se detecta por inmunohistoquímica en la unión mucosa/submucosa del tejido de las encías humanas.
- [0176]** Los inventores han observado un marcado de intensidad moderada a marcada de células inmunitarias en cantidad muy importante en las papilas dérmicas (cara bucal).
- 20 **[0177]** Los anticuerpos anti-CD16 (clon 2H7, ref ab74512, Abcam) reconocen la familia de los receptores activadores CD16.
- [0178]** La presencia de células que expresan CD16 se detecta por inmunohistoquímica en la unión
- 25 mucosa/submucosa del tejido de las encías humanas.
- [0179]** Los inventores han observado un marcado de intensidad moderada a marcada de células inmunitarias en baja cantidad en las papilas dérmicas (cara bucal).
- 30 **[0180]** Así, los inventores han mostrado que en las encías humanas, el equilibrio entre los receptores activadores CD16 y receptores CD32 (que comprenden receptores inhibidores) favorecía a estos últimos. Se han detectado en mayor cantidad en las papilas dérmicas. Por consiguiente, la presencia de un mayor número de receptores CD32 favorece la utilización de ligandos de CD32, y en particular de inmunoglobulina IgG₁, por vía mucosa, en particular por vía sublingual, en el hombre para tratar enfermedades y manifestaciones inflamatorias.
- 35

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-IgE de tipo IgG₁ con la capacidad de unir las IgE fijadas a los receptores de la superficie de un mastocito o basófilo sin disociar dichas IgE de sus receptores y de entrecruzar las IgE fijadas a los receptores de la superficie de un mastocito o basófilo, para usarlo en el tratamiento de una hipersensibilidad de tipo 1, dicho anticuerpo anti-IgE se administra por vía mucosa.
2. Anticuerpo anti-IgE para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-IgE reconoce una parte de la IgE no implicada en la fijación de la IgE a su receptor en el mastocito o basófilo.
3. Anticuerpo anti-IgE para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el anticuerpo anti-IgE es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o humanizado.
4. Anticuerpo anti-IgE para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo anti-IgE se administra por vía sublingual.
5. Anticuerpo anti-IgE para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la hipersensibilidad de tipo 1 se manifiesta por una anafilaxia sistémica, una anafilaxia localizada, una rinitis alérgica, asma, dermatitis atópica, una conjuntivitis, eccema, una mastocitosis inducida por un choque anafiláctico, una manifestación alérgica asociada a una parasitosis.
6. Compuesto farmacéutico para un uso en el tratamiento de una hipersensibilidad de tipo 1 por vía mucosa, que comprende un anticuerpo anti-IgE como el que se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. Compuesto farmacéutico para su uso según la reivindicación 6 que comprende además un alérgeno o un antígeno.
8. Compuesto farmacéutico para su uso según la reivindicación 6 o 7, en el que el compuesto se administra por vía sublingual.

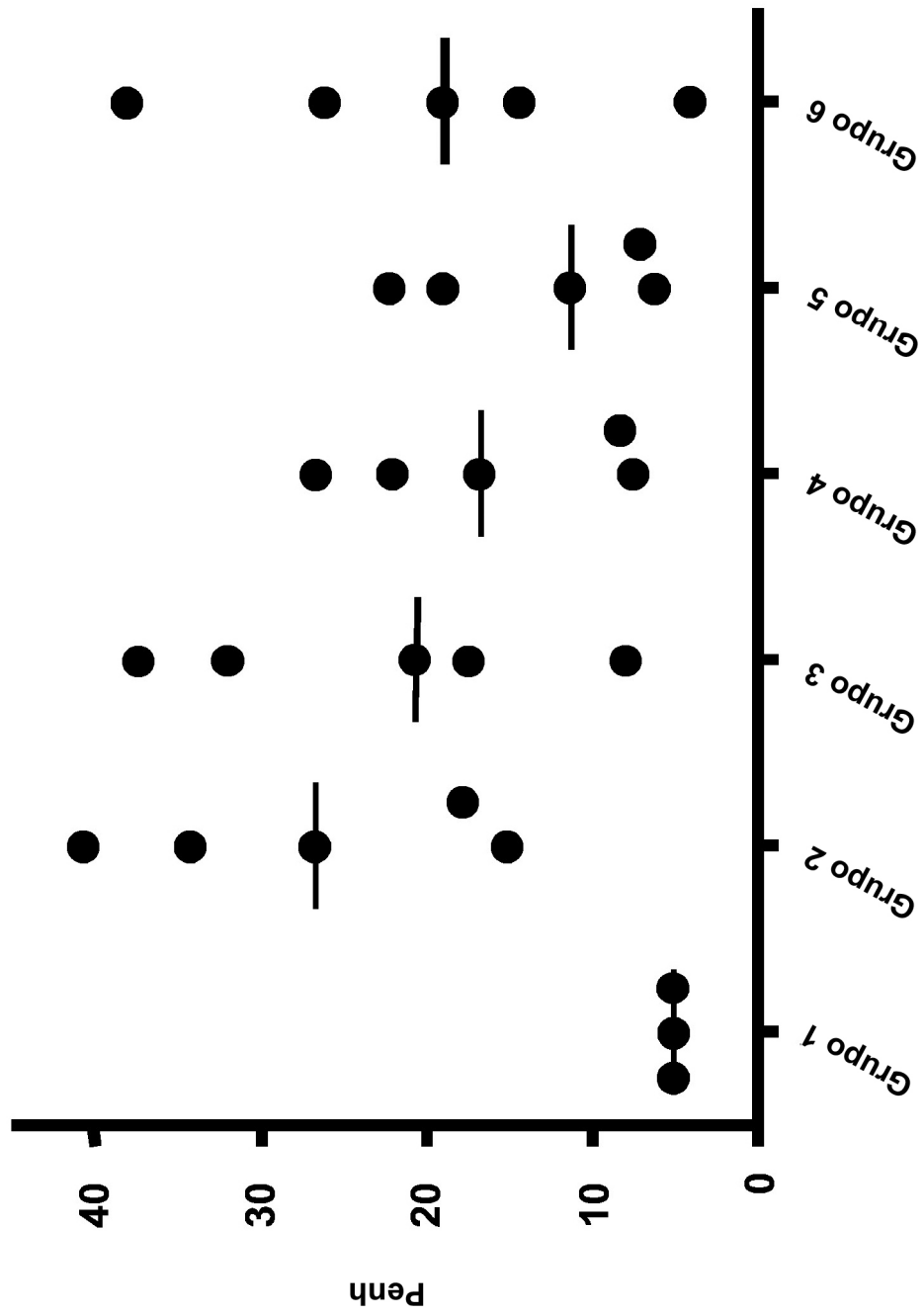
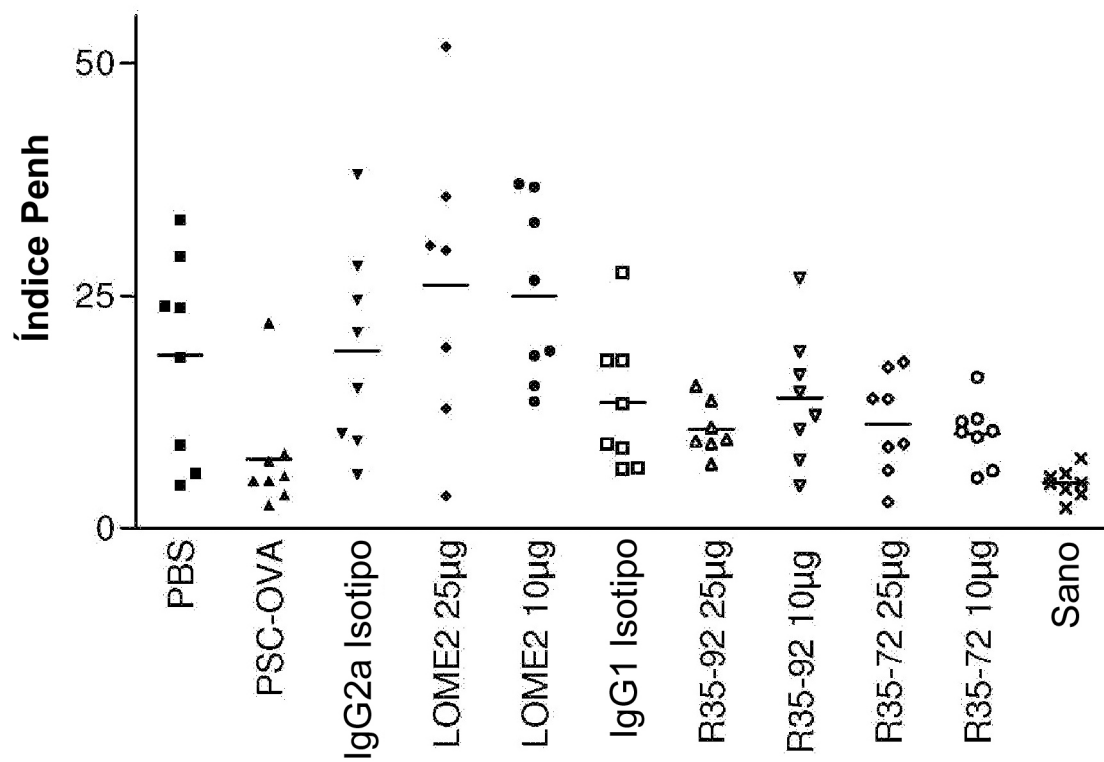


FIG.1

**FIG.2**

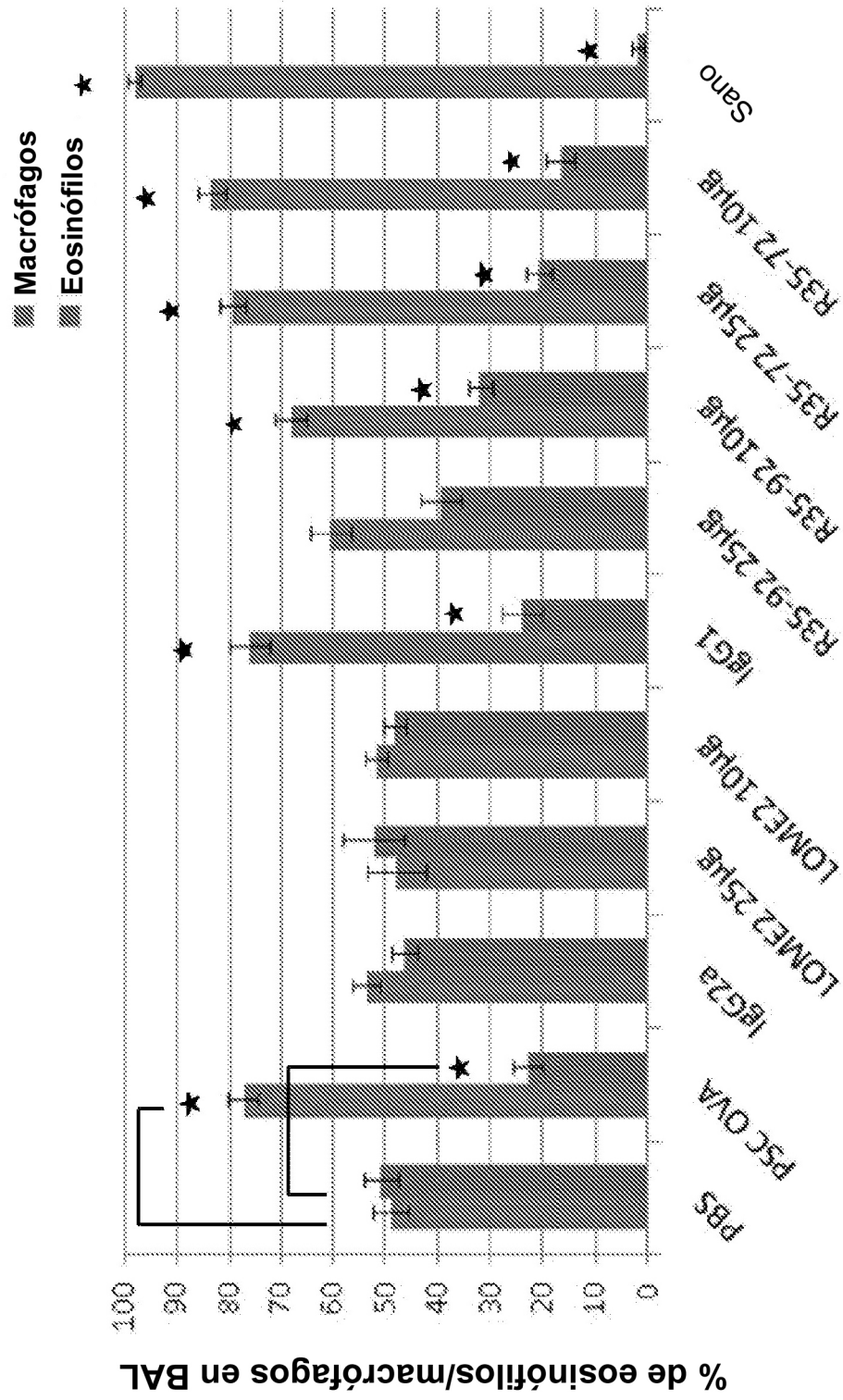


FIG.3