

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 157**

51 Int. Cl.:

C07K 16/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2013 PCT/EP2013/054722**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13132063**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013 E 13708170 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2822966**

54 Título: **Tratamiento de la mucositis con inmunoglobulina A**

30 Prioridad:

09.03.2012 EP 12158939

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

21.03.2018

73 Titular/es:

**CSL BEHRING AG (50.0%)
Wankdorfstrasse 10
3014 Bern, CH y
UNIVERSITAET BERN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AEBI, CHRISTOPH;
LUEER, SONJA CHRISTINA;
SCHAUB, ALEXANDER;
MIESCHER, SYLVIA;
ZUERCHER, ADRIAN y
VONARBURG, CÉDRIC PIERRE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 660 157 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

Tratamiento de la mucositis con inmunoglobulina A

La invención se refiere a composiciones que comprenden inmunoglobulina A para su uso en el tratamiento de la mucositis por aplicación tópica. En particular, la invención se refiere a composiciones que comprenden IgA que contiene la cadena J y al componente secretor para el tratamiento de la mucositis.

Los pacientes con cáncer sufren diversas secuelas relacionadas con la terapia. La mucositis del tubo digestivo es uno de los efectos adversos más debilitantes de la quimioterapia e irradiación (Sonis ST (2009) *Oral Oncol* 45, 1015-20). El dolor, las ulceraciones de las mucosas y las dificultades para ingerir alimentos que convierten en necesaria la nutrición parenteral afectan seriamente el bienestar del paciente y aumentan el riesgo de infección tanto local como sistémica (Elting, LS *et al.* (2003) *Cancer* 98: 1531-9). Además, la mucositis provoca retrasos en los ciclos posteriores de quimioterapia o radioterapia. Puede que sean necesarias pausas en el tratamiento, o una reducción de la dosis de la quimioterapia, lo que puede tener un efecto negativo en la supervivencia global. La mucositis también se presenta como un problema económico ya que su gestión requiere terapias caras y estancias hospitalarias prolongadas.

La actual terapia estándar para la mucositis depende predominantemente de medidas paliativas para controlar el dolor, pero no aborda los patomecanismos implicados en la mucositis.

La comprensión de la compleja patofisiología de la mucositis es clave para diseñar estrategias preventivas y/o terapéuticas. El concepto actual implica cinco fases que se solapan (Sonis ST (1998) *Oral Oncol* 34: 39-43): (1) La mucositis se inicia durante la administración de irradiación o fármacos citotóxicos. El daño comienza antes de que se produzcan los primeros cambios visibles y cuantificables desde un punto de vista clínico (por ejemplo, eritema de la mucosa), causado probablemente por el daño del ADN y/o las especies de oxígeno reactivas. (2) Se activan las rutas de respuesta al daño y las cascadas proinflamatorias. (3) Se cree que un círculo vicioso en el que se amplifican estas rutas de señalización, por ejemplo, liberación de TNF- α , activación de NK-kB y especies de oxígeno reactivas, potencia la muerte celular y, de esta manera, media en el daño de la mucosa. (4) Se desarrollan ulceraciones visibles, influenciadas negativamente por la presencia de una flora polimicrobiana en la superficie de la mucosa, que potencia la liberación de citocinas proinflamatorias (Ratner, AJ *et al.* (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3429-34). Los patógenos facultativos o comensales de la cavidad oral y del tubo gastrointestinal invaden las úlceras y pueden causar bacteremia. (5) La regeneración de la barrera de la mucosa ocurrirá únicamente después de que hayan remitido los estímulos tóxicos y las señales proinflamatorias, y se haya recuperado el recuento de neutrófilos.

Algunas de estas etapas y eventos patofisiológicos se pueden recrear con estudios *in vitro* y en modelos en animales. La exposición de células epiteliales a la radiación o agentes químicos utilizados normalmente para la quimioterapia (por ejemplo, metotrexato) es una estrategia apropiada para obtener un modelo del efecto y potencial daño colateral de la terapia contra el cáncer en células epiteliales presentes localmente. Esto corresponde a las etapas tempranas/iniciales de la mucositis oral (etapas 1, 2 y 3 tal como se han descrito anteriormente). Las células epiteliales que se pueden utilizar con este objetivo incluyen líneas celulares epiteliales queratinizadas (por ejemplo, de Detroit 532) y líneas celulares epiteliales no queratinizadas (por ejemplo, H376). De manera similar, la exposición de las células epiteliales a los patógenos oportunistas presentes en la microbiota oral simula las etapas tardías de la mucositis oral (etapa 3 y 4), especialmente la perpetuación de la inflamación provocada por microbios presentes localmente se puede estudiar en tales sistemas. Los patógenos oportunistas típicos presentes en el microbioma oral incluyen especies de *Streptococcus*, especialmente *S. mitis* y *S. pneumoniae* y en cierta medida también especies de *Moraxella*, incluida *M. catarrhalis* (The Human Microbiome Project Consortium (2012) *Nature* 486:207-214) (Dewhirst FE (2010) *J. Bacteriol* 192:5002-5017).

Además, diversos modelos *in vivo* en hámster, rata y ratón están muy establecidos, se utilizan con frecuencia y también están aceptados por las Autoridades Reguladoras. El modelo utilizado más comúnmente se basa en el hámster sirio dorado expuesto a radiación o a una combinación de radiación y quimioterapia; en el modelo se han descrito tanto intervenciones profilácticas como terapéuticas (Watkins B (2010) *Oral Dis* 16:655-660).

Existe una correlación directa entre la intensidad del tratamiento para el cáncer y el riesgo de desarrollar mucositis. Se ha observado un mayor riesgo en pacientes que desarrollaron mucositis en ciclos de tratamiento previos. Los factores relacionados con el estrés tal como la ansiedad también aumentan el riesgo. La naturaleza y grado de la microflora de la mucosa y las posibles modificaciones de la microflora existente por parte de los tratamientos para el cáncer también pueden potenciar los estímulos inflamatorios.

Se han identificado como posibles dianas para el tratamiento y/o la profilaxis de la mucositis la alteración de las señales proinflamatorias y la reducción de la carga microbiana. Únicamente se ha observado que tienen efectos significativos 7 agentes estudiados en más de un ensayo aleatorio comparativo, pero la mejora observada era poco importante. Se observó que las pastillas orales que contenían polimixina, tobramicina y anfotericina B tenían un efecto favorable (Stokman MA *et al.* (2003) *Br J Cancer* 88: 1012-6; Wijers OB *et al.* (2001) *Int J Radiat Oncol Biol*

5 *Phys* 50: 343-52), aunque el uso de antimicrobianos locales en la mucositis no se recomienda de manera habitual (Donnelly JP *et al.* (2003) *Lancet Infect Dis* 3: 405-12). En la actualidad se cree que los microorganismos puede que no causen el inicio de la mucositis, pero desempeñan una función en las etapas posteriores. Recientemente, se ha mostrado que el factor de crecimiento de queratinocitos recombinante (KFG, por sus siglas en inglés) mejora de manera significativa la mucositis (Blijlevens N y Sonis, S (2007) *Ann Oncol* 18: 817-26).

10 Schedler M.G. *et al.* (Tumor Diagnostik und Therapie (1994) 15, 184-191) divulgan que la administración intramuscular de la inmunoglobulina humana a pacientes con tumores de las vías digestivas y respiratorias altas que están recibiendo radioterapia puede mejorar la mucositis. Mose S. *et al.* (*American Journal of Clinical Oncology* (1997) 20, 407-411) divulgan que la administración intramuscular de inmunoglobulina humana puede ser eficaz para prevenir la mucositis, en especial, en pacientes que están recibiendo quimioterapia. Plevova P. *et al.* (*Journal of the National Cancer Institute* (1997) 89, 326-327) proporcionan un pequeño estudio de casos de dos pacientes pediátricos que padecen leucemia linfoblástica aguda y están recibiendo tratamiento con metotrexato, donde la administración intravenosa de la inmunoglobulina aparentemente previno la aparición de la mucositis oral.

15 Por lo tanto, se necesitan de manera imperiosa tratamientos eficaces para la mucositis provocada por los planes terapéuticos relacionados con el cáncer. Se necesitan urgentemente nuevas estrategias para la prevención y tratamiento de la mucositis en el tubo digestivo, en particular, la mucositis oral.

Compendio de la invención

20 Los presentes inventores han descubierto de manera sorprendente que la mucositis del tubo digestivo, en particular la mucositis oral, se puede tratar de manera eficaz mediante la administración tópica de inmunoglobulinas, en particular de IgA y/o IgM.

Por lo tanto, un aspecto de la invención es una composición que comprende inmunoglobulina A para su uso en un método de prevención o tratamiento de la mucositis del tubo digestivo, en particular la mucositis oral, mediante la administración tópica a la mucosa en un sujeto, donde la inmunoglobulina no se purifica a partir de un donante humano o animal inmunizado con TNF- α .

25 Preferentemente, la composición con inmunoglobulinas para su uso de acuerdo con la invención comprende IgA e IgM, más preferentemente, la inmunoglobulina comprende IgA que contiene la cadena J o IgM que contiene la cadena J o combinaciones de estas. Preferentemente, la inmunoglobulina se puede obtener a partir de la sangre o un componente de esta, tal como el plasma o fracciones del plasma. Más preferentemente, la composición de la invención también comprende el componente secretor. Preferentemente, el componente secretor es componente secretor recombinante.

30 En un aspecto preferido de la invención, la composición para su uso de acuerdo con la invención comprende IgA de tipo secretor. La composición también puede comprender IgA de tipo secretor combinada con otra inmunoglobulina, preferentemente combinada con IgM, preferentemente IgM de tipo secretor.

35 Un aspecto adicional de la invención es la composición para su uso tal como se ha descrito anteriormente, formulada para proporcionar un tiempo de contacto prolongado con el área de la mucosa afectada (o en riesgo de verse afectada) por la mucositis. Preferentemente, la composición se formula como una crema, un gel, un jarabe, una jalea, una forma sólida que se disuelve cerca de la mucosa afectada o combinaciones de estos. Otra composición preferida para su uso de acuerdo con la invención es una composición líquida que se formula para que se pueda retener en la boca durante unos pocos minutos antes de tragarla o expulsarla. Preferentemente, la formulación líquida comprende sustancias saborizantes para que el sabor sea agradable. Tales sustancias pueden conferir sabor de frutas tales como fresa, manzana, melocotón, arándano; un sabor de caramelo, chocolate; también se pueden utilizar sabores salados, tales como queso o tomate. La composición también puede comprender otros excipientes adecuados, por ejemplo, agentes estabilizantes que potencian la estabilidad de las inmunoglobulinas.

45 Otro aspecto más de la invención es la composición para su uso tal como se ha descrito anteriormente, donde la aplicación tópica a la mucosa reduce la adherencia y/o invasión de un microorganismo o microorganismos, tales como bacterias u hongos. El microorganismo puede ser parte de la microflora de la superficie de la mucosa.

50 Un aspecto adicional de la invención es la composición para su uso tal como se ha descrito anteriormente, donde la aplicación tópica a la mucosa fomenta la curación de heridas de la mucosa. Preferentemente, la composición de la invención estimula las células epiteliales para que secreten factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de queratinocitos.

Un aspecto adicional más de la invención es la composición para su uso de acuerdo con la invención, donde la aplicación tópica a la mucosa ejerce un efecto antiinflamatorio. El efecto antiinflamatorio puede ser

(a) inhibición de la expresión de citocinas proinflamatorias; y/o

(b) estimulación de la expresión de citocinas antiinflamatorias.

Otro aspecto de la invención es la composición para su uso tal como se ha descrito anteriormente, donde el sujeto está en riesgo de desarrollar mucositis del tubo digestivo, tal como un paciente con cáncer que está recibiendo o que está a punto de recibir quimioterapia y/o radioterapia. En particular, un sujeto en riesgo de desarrollar mucositis es un paciente con cáncer que desarrolló mucositis como resultado de un tratamiento previo de quimioterapia y/o radioterapia. El tratamiento previo de quimioterapia y/o radioterapia puede ser un ciclo de tratamiento anterior en una serie de ciclos de tratamiento, o una parte del tratamiento de una serie de ciclos de tratamiento en un paciente que estaba en remisión tras recibir quimioterapia y/o radioterapia, pero en el que el cáncer ha reaparecido y está indicada otra serie de quimioterapia y/o radioterapia. Preferentemente, la administración de la composición comienza cuando el recuento de neutrófilos del paciente empieza a disminuir. Preferentemente, el tratamiento se mantiene durante el periodo en el que el recuento de neutrófilos del paciente está por debajo de lo normal.

La composición para su uso de acuerdo con la invención se administra al sujeto hasta 6 veces al día, preferentemente hasta 5 veces al día, más preferentemente hasta 4 veces al día, aún más preferentemente hasta 3 vez al día, de la manera más preferida hasta 2 veces al día o incluso con una frecuencia menor.

En otro aspecto de la invención, la composición para su uso de acuerdo con la invención comprende un agente eficaz adicional para el tratamiento de la mucositis, tal como un factor de crecimiento o un agente antiséptico. En la invención también se incluye un producto que comprende la composición de la invención y un segundo agente activo en forma de un preparado combinado para el uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento de la mucositis del tubo digestivo. Un segundo agente activo de este tipo puede ser, por ejemplo, un agente que fomenta la curación de heridas, tal como un factor de crecimiento, un agente antimicrobiano tal como un agente antiséptico, por ejemplo, un colutorio bucal antiséptico, o un agente antiinflamatorio.

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha mencionado anteriormente, la mucositis en los pacientes con cáncer, en particular la mucositis oral, aún se considera un problema médico importante y se necesita un tratamiento eficaz. Los presentes inventores han descubierto recientemente de manera sorprendente que la mucositis del tubo digestivo, en particular la mucositis oral, se puede tratar de manera eficaz mediante la administración tópica de inmunoglobulinas, en particular de IgA y/o IgM.

Por lo tanto, un aspecto de la invención es una composición que comprende inmunoglobulina A para su uso en un método para la prevención o tratamiento de la mucositis del tubo digestivo, en particular la mucositis oral, mediante la administración tópica en un sujeto. Preferentemente, la inmunoglobulina es inmunoglobulina humana.

Preferentemente, la inmunoglobulina para su uso de acuerdo con la invención comprende IgA o IgM o una combinación de estas, más preferentemente, la inmunoglobulina comprende IgA que contiene la cadena J o IgM que contiene la cadena J o una combinación de estas. Preferentemente, la inmunoglobulina se puede obtener de la sangre o un componente de esta, tal como plasma, plasma pobre en crioprecipitado o fracciones del plasma. Más preferentemente, las inmunoglobulinas se purifican a partir de fracciones secundarias que se obtienen durante el procesamiento del plasma para la purificación de otras proteínas plasmáticas, por ejemplo, inmunoglobulina G. Preferentemente, la inmunoglobulina no se obtiene de la leche o calostro. Preferentemente, la inmunoglobulina no se modifica tras la purificación mediante alterando la glucosilación *in vitro*, por ejemplo, mediante adición enzimática o eliminación de residuos de azúcar, por ejemplo, manosa o ácido siálico o galactosa. Preferentemente, la inmunoglobulina no es un anticuerpo anti-TNF puro ni inmunoglobulina enriquecida en anti-TNF ni purificada de un donante humano o animal inmunizado con TNF- α .

En otro aspecto de la invención, la composición para su uso de acuerdo con la invención también comprende un componente secretor. Preferentemente, el componente secretor es componente secretor recombinante, preferentemente componente secretor producido en una línea celular de mamíferos.

La expresión "componente secretor" tal como se utiliza en la presente se refiere a una proteína que se une específicamente a la inmunoglobulina que contiene la cadena J, y está relacionada o es idéntica o se puede obtener a partir de una porción extracelular del receptor para inmunoglobulinas poliméricas (pIgR, por sus siglas en inglés), preferentemente un pIgR de mamíferos, más preferentemente un pIgR de primates, de la manera más preferida pIgR de seres humanos. Preferentemente, el componente secretor confiere una mayor estabilidad a la inmunoglobulina que contiene la cadena J. El componente secretor en su significado tradicional y limitado (denominado "componente secretor natural" en la presente) es la porción extracelular del receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR), que se asocia normalmente durante la secreción con IgA dimérica o polimérica o IgM pentamérica que comprende una cadena J. La IgA/IgM que contiene la cadena J se une al receptor de inmunoglobulinas poliméricas en la superficie basolateral de las células epiteliales y es incorporada a la célula por transcitosis. Este complejo receptor transita a continuación a través de los compartimentos celulares antes de ser transportado a la superficie luminal de las células epiteliales. El complejo IgA/IgM-pIgR que ha experimentado transcitosis es liberado a continuación mediante proteólisis, y parte del receptor para inmunoglobulinas poliméricas

(plgR), denominado componente secretor natural, permanece asociado con IgA/IgM que contiene la cadena J, y se libera así IgA/IgM secretora. Sin embargo, se dispone de pruebas de que también se puede producir la transcitososis inversa de IgA, es decir desde la superficie luminal hasta la superficie basolateral.

5 El plgR humano se clona y secuencian, su secuencia se puede consultar en la entrada P01833 de SwissProt, y se muestra en la Seq ID NO: 1. El plgR humano es una glucoproteína con 764 residuos aminoacídicos, que contiene un péptido señal (residuos 1 a 18), una parte extracelular (residuos 19 a 638), una región transmembrana (residuos 639 a 661) y una región citoplasmática (residuos 662 a 764). Se cree que los residuos 19 a 603 se asocian con IgA que contiene la cadena J o IgM que contiene la cadena J, tal como se ha descrito anteriormente, y esta parte de la glucoproteína se denomina normalmente el componente secretor ("componente secretor natural").

10 El componente secretor utilizado en la composición para su uso de acuerdo con la invención puede comprender cualquier secuencia de plgR extracelular que es capaz de asociarse con IgA que contiene la cadena J. Por ejemplo, el componente secretor puede comprender dominios extracelulares de plgR que proceden de mamíferos, por ejemplo, de primates, ganado, caballos, gatos, perros, conejos, cobayas, ratas o ratones o variantes de estos. Los híbridos funcionales de los dominios extracelulares de varias especies de mamíferos o variantes de estos también se contemplan para su uso en la invención, por ejemplo, preparados fusionando dominios de tipo inmunoglobulina de diferentes especies con una proteína de tipo componente secretor. También se puede formar un componente secretor funcional fusionando una selección de dominios de tipo inmunoglobulina presentes normalmente, por ejemplo, el componente secretor de conejo es funcional estando compuesto únicamente de los dominios 1, 4 y 5. Preferentemente, sin embargo, se utiliza el componente secretor humano o variantes funcionales de este.

20 Por lo tanto, el componente secretor utilizado en la composición para su uso de acuerdo con la invención comprende preferentemente los residuos 19 a 603 de la SEQ ID NO: 1 o variantes funcionales de estos. Las variantes funcionales pueden incluir deleciones, inserciones y/o sustituciones, preferentemente las sustituciones son sustituciones conservadoras, por ejemplo, un residuo aminoacídico básico sustituye a otro residuo aminoacídico básico, un aminoácido hidrófobo sustituye otro aminoácido hidrófobo, etc. La secuencia del componente secretor variante es al menos un 50% idéntica a los residuos 19 a 603 de la SEQ ID NO: 1, preferentemente al menos un 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, más preferentemente al menos un 85% o incluso un 90%, aún más preferentemente al menos un 92%, 94%, 95%, 97%, 98% o incluso un 99% idéntica a los residuos 19 a 603 de la SEQ ID NO: 1. De la manera más preferida el componente secretor comprende o incluso está constituido por los residuos 19 a 603 de la SEQ ID NO: 1.

30 El experto sabe perfectamente cómo producir el componente secretor mediante técnicas recombinantes. Phalipon *et al.* (Phalipon A et al (2002) *Immunity* 17:107-115) han descrito un ejemplo de la expresión del componente secretor humano en células CHO, pero la invención no se limita al componente secretor producido mediante este sistema. Por ejemplo, la secuencia de ADNc deseada se puede producir de manera sintética o clonarse mediante RT-PCR, utilizando ARN aislado de células o tejido que expresan plgR como molde. El ADNc se puede insertar a continuación en un vector de expresión de mamíferos tal como pcDNA3 (hay disponibles muchos vectores de expresión alternativos y el experto está muy familiarizado con ellos). A continuación, el vector de expresión recombinante se introducirá en una línea celular hospedador adecuada, tal como CHO, Cos HEK293 o BHK. Hay disponibles otras líneas celulares que también se puede utilizar. Los métodos para introducir tales vectores en una línea celular incluyen la lipofección, electroporación y otras técnicas muy conocidas por el experto. Normalmente las células que alojan el vector de expresión y que expresan la proteína de interés se seleccionan después y se clonan. También se pueden utilizar sistemas de expresión virales, por ejemplo, se puede utilizar el virus Vaccinia para expresar altos niveles de proteínas en células de mamífero, se pueden utilizar sistemas de expresión de baculovirus para expresar niveles elevados de proteínas en células insectos. También se pueden contemplar sistemas de expresión de levaduras o bacterias y el experto está familiarizado con tales sistemas de expresión. También se pueden utilizar sistemas de expresión vegetales y el experto está familiarizado con ellos.

45 El componente secretor o la variante de este utilizado en la composición para su uso de acuerdo con la invención puede también comprender una etiqueta, tal como una etiqueta hexa-histidina, que puede ayudar a la purificación de la proteína resultante. Si se une una etiqueta de este tipo mediante un conector escindible, la etiqueta se puede eliminar por escisión antes del uso en la invención. De manera similar, el componente secretor se puede producir como una proteína de fusión. Nuevamente, se puede utilizar un conector escindible de manera que el compañero de fusión se pueda eliminar mediante escisión del componente secretor antes del uso en la invención.

50 El experto puede purificar a continuación la proteína expresada mediante métodos estándar.

También se puede obtener el componente secretor a partir de una fuente natural, preferentemente a partir de leche, saliva o moco. Preferentemente, el componente secretor tiene un origen humano, pero también se puede utilizar en la invención el componente secretor procedente de otras especies.

55 La relación molar entre el componente secretor y la cadena J en la composición está entre 1:10 y 10:1, preferentemente entre 1:5 y 5:1, más preferentemente entre 1:2 y 2:1.

La cantidad del componente secretor utilizado en la composición puede ser de 1 parte (en peso) de componente secretor respecto a al menos 50 partes (en peso) de proteína en la composición, preferentemente 1 parte respecto a al menos 40, 30, 20, 15, 10, de la manera más preferida 1 parte de componente secretor respecto a al menos 5 partes de proteína en la composición.

5 En un aspecto preferido de la invención, la composición para su uso de acuerdo con la invención comprende IgA de tipo secretor. La composición también puede comprender IgA de tipo secretor combinada con otra inmunoglobulina, preferentemente combinada con IgM, preferentemente IgM de tipo secretor. En otro aspecto preferido de la invención, la composición para su uso de acuerdo con la invención también puede comprender IgM de tipo secretor sola o combinada con otras inmunoglobulinas.

10 Un aspecto adicional de la invención es la composición para su uso tal como se ha descrito anteriormente, formulada para proporcionar un tiempo de contacto prolongado con el área de la mucosa afectada (o en riesgo de verse afectada) por la mucositis. El "tiempo de contacto" se refiere a la duración del tiempo que la composición o partes de esta siguen siendo activas sobre la superficie de la mucosa afectada o la superficie de la mucosa en riesgo. Preferentemente, el tiempo de contacto es superior a unos pocos minutos, más preferentemente horas, incluso más preferentemente días, de la manera más preferida lo suficientemente prolongado para ejercer un efecto biológico que es la prevención o el tratamiento de la mucositis. Preferentemente, la composición se formula como una crema, un gel, un jarabe, una jalea, una forma sólida que se disuelve cerca de la mucosa afectada o combinaciones de estos. La composición también se puede formular como un comprimido, que comprende uno o más excipientes adecuados tales como sacarosa, lactosa, maltodextrina, almidón (por ejemplo, de maíz), derivados de celulosa, por ejemplo, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, o acrilato, resinas de ácido metacrílico, aceite (por ejemplo, aceite de oliva), cera de abejas o agentes similares, solos o combinados. También puede comprender componentes efervescentes. Se puede formar un gel, por ejemplo, utilizando gelatina porcina o materiales que tienen como base almidón, propilenglicol, PEG 40, solvato de potasio, benzoato de sodio, cloruro de benzalconio, sacarosa, hialuronato de sodio, hidroxietilcelulosa o agentes similares. Se puede formar un jarabe añadiendo uno o más azúcares, polioles de azúcares como glicerol o sorbitol, ácidos para prevenir la recristalización del azúcar, agentes tamponantes, agentes quelantes, agentes saborizantes y potenciadores de los sabores, agentes colorantes. Se puede formar una jalea, por ejemplo, utilizando gelatina, por ejemplo, gelatina porcina.

20 Como alternativa, se utiliza una composición líquida, formulada para que se pueda retener en la boca durante unos pocos minutos antes de tragarla o expulsarla. Preferentemente, la formulación líquida comprende sustancias saborizantes de manera que el sabor sea agradable. Tales sustancias pueden conferir sabor de frutas tales como fresa, manzana, melocotón, arándano frutos secos; un sabor de caramelo, chocolate, nueces o similares; también se pueden utilizar sabores salados, tales como queso o tomate. La composición también puede comprender otros excipientes adecuados, por ejemplo, agentes estabilizantes que potencian la estabilidad de las inmunoglobulinas, agentes colorantes, sustancias tamponantes, etc.

30 La composición se puede aplicar directamente en la boca, si el sujeto está en riesgo de desarrollar mucositis oral, también se puede tomar por vía oral, en una formulación que está diseñada para liberarla en otras partes del tubo digestivo. También se puede administrar por vía anal y se puede suministrar en cualquier formulación adecuada para esta forma de administración. Se puede administrar en una formulación que controla su liberación en ciertas áreas del tubo digestivo. El experto será capaz de formular la composición de la invención para lograr el tiempo de contacto deseado con la mucosa de la manera que desee.

40 Otro aspecto más de la invención es la composición para su uso tal como se ha descrito anteriormente, donde la aplicación tópica a la mucosa reduce la adherencia y/o invasión de un microorganismo o microorganismos, tales como bacterias u hongos. El microorganismo puede ser parte de la microflora de la superficie de la mucosa, por ejemplo, la microbiota oral o la microbiota intestinal. Preferentemente, la composición comprende una inmunoglobulina que se une al microorganismo y/o toxina producida por el microorganismo. Preferentemente la adherencia y/o invasión por parte de los microorganismos a la superficie de la mucosa intacta o con lesiones se reduce en al menos un 25%, preferentemente en al menos un 30%, 35%, 40%, 45%, más preferentemente en al menos un 50%, idealmente en un grado aún mayor tal como al menos un 60%, 70%, 80%, 90% con el fin de, por ejemplo, prevenir la activación de las cascadas posteriores proinflamatorias intracelulares, que se generan tras la unión de componentes específicos de la superficie microbiana (por ejemplo, PAMP, patrones moleculares asociados a patógenos) con PRR ((siglas en inglés de receptor de reconocimiento de patrones) por ejemplo, receptores de tipo Toll) intracelulares o expuestos en la superficie.

55 Un aspecto adicional de la invención es la composición para su uso tal como se ha descrito anteriormente, donde la aplicación tópica a la mucosa fomenta la curación de heridas de la mucosa. Preferentemente, la composición de la invención estimula las células epiteliales para que secreten uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF, por sus siglas en inglés) u otros factores que fomentan la curación de heridas tales como el factor de crecimiento epitelial (EGF, por sus siglas en inglés), factores de crecimiento de fibroblastos (por ejemplo, bFGF, por sus siglas en inglés), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), factores de crecimiento transformantes (por ejemplo, TGF- α o β),

factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, la composición puede estimular las células epiteliales y los fibroblastos de la lámina propia para que secreten componentes de la matriz extracelular tales como colágeno, laminina o fibronectina y fomenten la angiogénesis.

- 5 Preferentemente, la estimulación para secretar un factor de crecimiento es significativa desde un punto de vista biológico, por ejemplo, la secreción de un factor de crecimiento se estimula en tal medida que se consigue un efecto significativo en las células diana.

10 Un aspecto adicional más de la invención es la composición para su uso de acuerdo con la invención, donde la aplicación tópica a la mucosa ejerce un efecto antiinflamatorio. El efecto antiinflamatorio de la composición para su uso de acuerdo con la invención se puede caracterizar aún más en

(a) la inhibición de la expresión de citocinas proinflamatorias; y/o

(b) la estimulación de la expresión de citocinas antiinflamatorias.

15 Preferentemente, se reduce la expresión de una o más citocinas proinflamatorias clave en la mucosa mediante el uso de la composición de acuerdo con la invención, más preferentemente se reduce la expresión de dos o más citocinas proinflamatorias clave, aún más preferentemente, se reduce la expresión de tres o más citocinas proinflamatorias. Preferentemente, la citocina proinflamatoria se selecciona entre IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IP10. Preferentemente, la reducción de la expresión es una reducción de al menos un 25%, preferentemente en al menos un 30%, 35%, 40%, 45%, más preferentemente en al menos un 50%, idealmente en un grado aún mayor tal como al menos un 60%, 70%, 80%, 90% o superior.

20 Preferentemente, se estimula la expresión de una o más citocinas antiinflamatorias clave mediante la composición de la invención, más preferentemente, se estimula la expresión de dos o más citocinas antiinflamatorias, aún más preferentemente, se estimula la expresión de tres o más citocinas antiinflamatorias. Preferentemente, la citocina antiinflamatoria se selecciona entre IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, KGF- β . Preferentemente, la estimulación de la expresión es una estimulación de al menos 2 veces, más preferentemente de al menos 5, 10, 20, 50 veces, aún más preferentemente de al menos 100 veces, de la manera más preferida de más de 50 veces o incluso más.

Más preferentemente, se proporciona tanto una reducción de la expresión de citocinas proinflamatorias como una estimulación de la expresión de citocinas antiinflamatorias mediante el uso de la composición de acuerdo con la invención.

30 Otro aspecto de la invención es la composición para su uso tal como se ha descrito anteriormente, donde el sujeto en riesgo de desarrollar mucositis del tubo digestivo es un paciente con cáncer que está recibiendo o que está a punto de recibir quimioterapia y/o radioterapia.

35 En particular, un sujeto en riesgo de desarrollar mucositis es un paciente con cáncer que desarrolló mucositis como resultado de un tratamiento previo de quimioterapia y/o radioterapia. El tratamiento previo de quimioterapia y/o radioterapia puede ser un ciclo de tratamiento anterior en una serie de ciclos de tratamiento, o una parte del tratamiento de una serie de ciclos de tratamiento en un paciente que estaba en remisión tras recibir quimioterapia y/o radioterapia, pero en el que el cáncer ha reaparecido y está indicada otra serie de quimioterapia y/o radioterapia.

40 La composición para su uso de acuerdo con la invención se puede proporcionar de manera profiláctica o como tratamiento para una mucositis activa y existente. Preferentemente, se inicia el tratamiento antes de que se produzcan los síntomas de la mucositis. El tratamiento se puede iniciar antes, a la vez o después de comenzar la quimioterapia y/o radioterapia. Preferentemente, en los pacientes que reciben quimioterapia la administración de la composición comienza cuando el paciente se vuelve neutropénico (es decir, recuento absoluto de neutrófilos (ANC, por sus siglas en inglés) $< 0.5 \times 10^9/L$) y, por lo tanto, en riesgo de desarrollar mucositis. Preferentemente, se mantiene el tratamiento durante el periodo neutropénico hasta que el ANC comienza a recuperarse o alcanza $0.5 \times 10^9/L$ y la mucositis se ha resuelto desde un punto de vista clínico. Los agentes quimioterápicos que inducen con frecuencia mucositis incluyen, entre otros, metotrexato, antraciclinas, 5-fluorouracilo y pautas quimioterápicas mieloablativas. Preferentemente, en los pacientes que reciben terapia de radiación local, la composición se administra a lo largo de la totalidad de la duración de la terapia y hasta que se haya resuelto la mucositis.

45 La composición para su uso de acuerdo con la invención se administra al sujeto hasta 6 veces al día, preferentemente hasta 5 veces al día, más preferentemente hasta 4 veces al día, aún más preferentemente hasta 3 veces al día, de la manera más preferida 2 veces al día o incluso con una frecuencia menor.

50 En otro aspecto de la invención, la composición para su uso de acuerdo con la invención comprende un agente eficaz adicional para el tratamiento de la mucositis, tal como un factor de crecimiento o un agente antiséptico. En la invención también se incluye un producto que comprende la composición de la invención y un segundo agente activo en forma de un preparado combinado para el uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento de la

mucositis del tubo digestivo. Un segundo agente activo de este tipo puede ser, por ejemplo, un agente que fomenta la curación de heridas, tal como un factor de crecimiento, un agente antimicrobiano tal como un agente antiséptico, por ejemplo, un colutorio antiséptico o un agente antiinflamatorio.

5 La invención se ilustrará continuación en los siguientes ejemplos no limitantes haciendo referencia a las siguientes figuras.

Lista de figuras

10 **Figura 1.** Análisis de inmunotransferencia (electroforesis en gel de poliacrilamida con un 10% de dodecilsulfato de sodio) con 0.5 µg/mL de proteína por mm de ranura del gel con una inmunolectrotransferencia posterior y detección de OMP utilizando mAb17C7 (específico tanto para UspA1 como UspA2 triméricas y monoméricas) [recuadro A], mAb24B5 (específico para UspA1 monomérica) [recuadro B] y mAb10F3 (específico para CopB) [recuadro C]. Se utilizó un anticuerpo secundario de cabra anti-(IgG de ratón) conjugado con HRP para la detección del anticuerpo primario.

15 **Figura 2.** Análisis de inmunotransferencia (electroforesis en gel de poliacrilamida con un 10% de dodecilsulfato de sodio) con 0.4 µg/mL de proteína por mm de ranura del gel con una inmunolectrotransferencia posterior y detección de la unión del anticuerpo utilizando como fuente del anticuerpo primario saliva combinada humana (0.3 g/L) [recuadro A], IgA F4 plasmática [recuadro B] o IgG plasmática combinada (Privigen®) [recuadro C] y anticuerpos secundarios conjugados con HRP apropiados para la visualización utilizando quimioluminiscencia.

20 **Figura 3.** Ensayo de inhibición de la adherencia utilizando IgA F4. Se utilizaron MEM y MEM-PBS como controles negativos. Se utilizaron O35E.1 y O35.1 complementada con 5 mg/mL de IgA F4 como controles positivos. El valor p global (ANOVA unidireccional) fue < 0.0001; *indica un nivel de significación < 0.05.

Figura 4. Ensayo de inhibición de la adherencia utilizando IgA F5A. Se utilizaron MEM y MEM-PBS como controles negativos. Se utilizaron O35E.1 y O35.1 complementada con 5 mg/mL de IgA F5A como controles positivos. El valor p global (ANOVA unidireccional) fue < 0.001; *indica un nivel de significación < 0.05.

25 **Figura 5.** Ensayo de inhibición de la adherencia utilizando IgG (Privigen®). Se utilizaron MEM, MEM-prolina y MEM-PBS como controles negativos. Se utilizaron O35E.1 y O35E.1 complementada con 10 mg/mL de IgG como controles positivos. El valor p global (ANOVA unidireccional) fue 0.009; ninguna de las diferencias entre columnas alcanzó una significación estadística.

30 **Figura 6.** Ensayo de inhibición de la adherencia utilizando IgM F5A. Se utilizaron MEM y MEM-PBS como controles negativos. Se utilizaron O35E.1 y O35E.1 complementada con 5 mg/mL de IgM F5A como controles positivos. El valor p global (ANOVA unidireccional) fue < 0.001; *indica un nivel de significación < 0.05.

Figura 7. Ensayo de invasión de *M. catarrhalis* que demuestra que IgA F4 con una concentración de 10 mg/mL inhibe de manera significativa la penetración de bacterias en las células epiteliales. El valor p global (ANOVA unidireccional) fue 0.014; *indica un nivel de significación < 0.05. No se dispuso de controles fiables que mostraran una inhibición completa de la invasión celular.

35 **Figura 8.** Ensayo de invasión de *M. catarrhalis* que demuestra que IgG plasmática humana combinada (Privigen®) con una concentración de 10 mg/mL inhibe de manera significativa la penetración de bacterias en las células epiteliales. El valor p global (ANOVA unidireccional) fue 0.015; *indica un nivel de significación < 0.05. No se dispuso de controles fiables que mostraran una inhibición completa de la invasión celular.

40 **Figura 9.** Ensayo de invasión de *M. catarrhalis* que demuestra que IgM F5A con una concentración de 5 y 2.5 mg/mL inhibe de manera significativa la penetración de bacterias en las células epiteliales. El valor p global (ANOVA unidireccional) fue < 0.0001; *indica un nivel de significación < 0.05. No se dispuso de controles fiables que mostraran una inhibición completa de la invasión celular.

45 **Figura 10.** Se evaluó la actividad antiinflamatoria de IgA F4 utilizando células Detroit 562 estimuladas con la proteína de la membrana externa (OMP, por sus siglas en inglés) de *M. catarrhalis*. Se aplicaron concentraciones crecientes de IgA en las células en el momento de la estimulación con OMP. Se midieron las secreciones de MCP-1 (A), IL-8 (B) e IL-6 (C) por parte de las células Detroit 562 al comienzo de la estimulación (t=0) y 24 h más tarde (t=24) utilizando una matriz de suspensión múltiple (tecnología Luminex). Los controles negativos son las muestras en las que no se añadió OMP.

50 **Figura 11.** Se evaluó la actividad antiinflamatoria de IgA F4 utilizando células H376 y HG1. Se aplicaron concentraciones crecientes de IgA en células H376 y HGF-1 en reposo o en el momento de la estimulación (células HGF-1). Se midieron las secreciones de IP-10 (A) y G-CSF (B) por parte de H376 e IP-10 por parte de células HGF-1 (C) 24 h después de la estimulación utilizando una matriz de suspensión múltiple (tecnología Luminex).

Figura 12. Ensayo de inhibición de la adherencia utilizando IgA F4. IgA F4 interfiere con la habilidad de adherirse de *S. pneumoniae* R6 (A) y *S. mitis* (B) a las células H376.

Figura 13. Ensayo de citotoxicidad celular utilizando IgA F4. Reducción del efecto de la dosis de IgA F4 en la muerte celular inducida por radiación y de las células H376. (A) El experimento se realizó tal como se muestra en la línea temporal. (B) 24 h después de la irradiación, se midió la muerte celular utilizando el ensayo de citotoxicidad CytoTox-Glo™ (Promega). Los números corresponden a la muerte celular específica respecto a la citotoxicidad total que se midió en muestras de células H376 tratadas con digitonina.

Figura 14. Ensayo de curación de heridas utilizando IgA F4. (A) El experimento se realizó tal como se muestra en la línea temporal. (B, C, D) Se documentó el cierre de la brecha artificial en la monocapa de células capturando imágenes del araño en diferentes intervalos de tiempo y se midió el tamaño de la brecha. Un 100% de reepitelización de la herida corresponde a una recuperación total de la brecha artificial.

Figura 15. Análisis de los receptores de IgA en las líneas celulares epiteliales. Se realizaron tinciones de CD71 y CD89 (o controles del isotipo relevantes) en las células H376 y Detroit y se analizaron utilizando un citómetro de flujo.

Figura 16. Se evaluó mediante ELISA la actividad anti-TNF en preparados de IgA F4 e IgG. Se recubrieron los pocillos de una placa ELISA con TNF α (1 μ g/mL) y después se bloquearon. Se aplicaron concentraciones crecientes de IgA F4, IgG y un anticuerpo anti-TNF α (monoclonal, infliximab) a los pocillos. En algunos pocillos, se añadió TNF α libre para inhibir la unión específica de los anticuerpos estudiados (ensayo de competición; barras). Después de los lavados se revelaron las inmunoglobulinas unidas a TNF α con anticuerpos secundarios específicos marcados con HRP.

Ejemplos

El estudio englobado en los ejemplos muestra que las inmunoglobulinas pueden tener un efecto combinado antimicrobiano y antiinflamatorio/favorecedor de la curación de heridas y, por lo tanto, constituyen una opción atractiva para una profilaxis y tratamiento eficaces de la mucositis del tubo digestivo, en particular la mucositis oral.

Para imitar la capa celular epitelial de la mucosa de la cavidad orofaríngea se utilizaron líneas celulares epiteliales. Un ejemplo de una línea celular adecuada para tales estudios es la línea celular faríngea humana Detroit 562 (ATCC CCL 138). Otras líneas celulares adecuadas utilizadas son H376, una línea celular de carcinoma escamoso con origen en el suelo de la boca y HGF-1 una línea celular fibroblástica gingival. Como un ejemplo de un microorganismo que es parte de la microflora de la mucosa, los autores utilizaron *Moraxella catarrhalis*, que es un patógeno naso- y orofaríngeo típico, así como también otras bacterias detectadas en la microbiota oral, tales como especies de *Streptococcus*. Este sistema experimental modelo se consideró adecuado para los experimentos *in vitro* preliminares, debido a que el origen de las líneas celulares corresponde al sitio de acción previsto (preferido) de la inmunoglobulina administrada por vía oral. Además, se ha mostrado previamente que las células Detroit muestran activación proinflamatoria tras la exposición a bacterias (bacterias intactas vivas o inactivadas o componentes de la superficie bacteriana). Se escogió *M. catarrhalis*, que es un patógeno facultativo, cuyo único hábitat natural es la faringe humana debido a su capacidad de adherirse a las células Detroit y penetrar en ellas *in vitro*, y debido a que induce la secreción de mediadores proinflamatorios tales como IL-6, IL-8, TNF α , MCP-1 y GM-CSF. Además, proteínas específicas de la membrana externa de *M. catarrhalis* (por ejemplo, UspA1 y UspA2) median tanto la adherencia como la invasión y desencadenan la cascada proinflamatoria al unirse a CEACAM1 y TLR2. Se pueden adquirir mutantes isogénicos con una inactivación génica de estas proteínas de la membrana externa. UspA1 y UspA2 de *M. catarrhalis* son inmunógenos conocidos reconocidos por el sistema inmunitario humano e inducen IgA e IgM plasmáticas y salivares específicas en individuos sanos. Además, se utilizaron las especies de *Streptococcus*, en particular *S. mitis* y *S. pneumoniae*, como patógenos oportunistas típicos presentes en la cavidad oral. Por lo tanto, este modelo *in vitro* es adecuado para evaluar los efectos de los preparados de inmunoglobulinas humanas en la adherencia e invasión bacterianas y en la inducción bacteriana de la inflamación.

Ejemplo 1: Los preparados de inmunoglobulinas procedentes del plasma y procedentes de la saliva comprenden anticuerpos que reconocen *M. catarrhalis*

Para estudiar si los preparados de inmunoglobulinas de los autores podían tener un efecto antimicrobiano, los autores quisieron establecer en primer lugar si contenían anticuerpos que reconocían un potencial patógeno detectado en la superficie de las mucosas del tubo orofaríngeo. Como un ejemplo de tal microorganismo, utilizaron *M. catarrhalis*.

1.1 Cepas bacterianas y líneas celulares humanas. Se adquirió la cepa 25238 de *M. catarrhalis* de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés). La cepa de laboratorio O35E es un aislado del oído medio procedente de un niño con otitis media. Las bacterias se cultivaron en placas de agar con infusión de cerebro-corazón (BHI, por sus siglas en inglés) (Difco, Detroit, MI) a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ o en cultivo BHI a 37 °C y 200 revoluciones por minuto (rpm). En algunos experimentos, se

inactivaron térmicamente las bacterias resuspendiendo bacterias vivas en PBS e incubando a 60 °C durante 60 min. Se mantuvo la línea celular faríngea humana Detroit 562 (ATCC CCL 138) en medio esencial mínimo de Eagle (MEM; Invitrogen, Basilea, Suiza) complementado con un 10% de suero bovino fetal (FCS, por sus siglas en inglés) inactivado térmicamente, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM (Sigma, St. Louis, MO), aminoácidos no esenciales 1x (Sigma), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina a 37 °C en un 5% de CO₂.

1.2. Reactivos. Se obtuvieron isotipos de inmunoglobulina humana combinados (IgA ("IgA F4" [50 mg/mL], "IgA F5A" [50 mg/mL]) IgG (Privigen® [100 mg/mL] e IgM ("IgM F5A" [10 mg/mL]), respectivamente) de CSL Behring, Berna, Suiza. El preparado de IgG es un preparado de IgG intravenoso (IVIg, por sus siglas en inglés) para seres humanos comercializado (Privigen®). Las fracciones de IgA e IgM plasmáticas humanas son productos experimentales. Se produjo IgA a partir de plasma mediante elución secuencial de la columna MPHQ y la separación posterior mediante cromatografía por afinidad. Se obtuvo la fracción F4 a partir del paso de cromatografía AIEX del proceso de producción de IVIg de CSL Behring AG (Berna, Suiza) después de un lavado posterior de la columna Macro-Prep High Q (Bio-Rad, Hercules, CA) con fosfato 10 mM/acetato 30 mM a pH 6.5 eluyendo con tartrato 55 mM/acetato 5 mM a pH 7.6. La fracción F5 se eluyó posteriormente con fosfato 50 mM/citrato 25 mM a pH 5.0. F4 y F5 se ajustaron a aproximadamente 1 mg/mL en PBS mediante ultra-/diafiltración y después se eliminó IgG mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina IgSelect (GE Healthcare, Glattbrugg, Suiza). IgA F4 se recolectó directamente en el flujo de paso de la cromatografía IgSelect de la carga de F4. Para obtener IgA F5, se eliminó IgM del flujo de paso de IgSelect de la carga F5 mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina CaptureSelect Human IgM (Bioaffinity Company BAC). La elución de esta resina Capture Select Human IgM dio como resultado la fracción IgM F5 utilizada en este trabajo. Se ajustó la concentración final de IgA F4, IgA F5 e IgM F5 mediante ultra-/diafiltración.

1.3. Ensayo de inmunotransferencia. Se obtuvieron los preparados de la proteína de la membrana externa (OMP) de las cepas 25238 y O35E mediante el método de EDTA-tampón (Murphy TF y Loeb MR (1989) *Microb Pathog* 6: 159-74) y se resolvieron mediante SDS-PAGE (10% de poliacrilamida) con una concentración proteica de 0.5 y 0.4 µg/mm de ranura del gel en las figuras 1 y 2, respectivamente. Los geles se electrotransfirieron posteriormente a membranas de PVDF (Immobilon-P®, Millipore Corporation, Bedford, MA). Se realizó el ensayo de inmunotransferencia utilizando anticuerpos monoclonales (17C7 (Aebi C *et al.* (1997) *Infect Immun* 65:4367-77), 24B5 (Cope LD *et al.* (1999) *J Bacteriol* 181: 4026-34), 10F3 (Aebi C *et al.* (1998) *Infect Immun* 66: 3113-9) [0.5% de sobrenadante de mAb, concentración absoluta no conocida]) y saliva o IgA o IgG humana combinada mencionada anteriormente (0.4 µg/mL) como anticuerpo primario y como anticuerpo secundario uno de cabra anti-(IgA o IgG humana) con una dilución 1:4000 marcado con peroxidasa de rábano picante (Sigma Corp., St. Louis, MO). Se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) para la detección de la unión del anticuerpo.

La Figura 1 demuestra que OMP de la cepa ATCC 25238 reacciona de manera vigorosa con los tres anticuerpos monoclonales dirigidos contra las principales proteínas OMP UpA1 (mAb 17C7 y mAb 24B5), UspA2 (mAb17C7) y CopB (mAb10F3) similar a la cepa O35E (Helminen ME *et al.* (1993) *Infect Immun* 61: 2003-10; Helminen ME *et al.* (1994) *J Infect Dis* 170: 867-72; Cope LD *et al.* (1999) *J Bacteriol* 181: 4026-34), a partir de la cual se generaron estos mAb y que es un estándar representativo del linaje filogenético 1 más relevante desde un punto de vista clínico y principal de *M. catarrhalis* (Meier PS *et al.* (2005) *Vaccine* 23:2000-8).

Los autores confirmaron posteriormente que el plasma y la saliva humanos contienen anticuerpos, los cuales reaccionan con OMP de *M. catarrhalis* de las dos cepas ATCC 25238 y O35E utilizando un ensayo de inmunotransferencia estándar (Stutzman *et al.* (2003) *Infect Immun* 71: 6793-8). La Figura 2 demuestra que tanto la saliva humana como OMP contienen múltiples antígenos que son reconocidos por IgA (saliva, OMP) y/o IgG humanas.

Fue importante determinar en primer lugar que la cepa ATCC 25238 se comportaba de manera similar respecto a la expresión de adhesinas de células epiteliales (mAb 17C7 y 25B4) que la cepa del grupo filogenético 1 de O35E estándar (Bootsma HJ *et al.* (2000) *J Infect Dis* 181: 1376-87) que se utiliza en todo el mundo como un aislado de *M. catarrhalis* de referencia del oído medio pediátrico y se utilizó para la generación de los anticuerpos monoclonales disponibles. La Figura 1 indica que este es el caso. Además, tal como se muestra en la Figura 2, IgA e IgG procedentes del plasma reconocen los mismos epítomos de la membrana externa de ATCC 25238, lo que valida en mayor medida la utilidad de esta cepa para las series de experimentos de los autores. Cabe destacar aquí que la adhesina principal UspA1 (reactiva con los dos mAb 17C7 y 24B5) contiene dominios que reaccionan con la fibronectina humana y con CEACAM 1 (Brooks MJ *et al.* (2008) *Infect Immun* 76: 5322-9) y, por lo tanto, debería ser capaz de unirse a una gran variedad de líneas celulares epiteliales humanas. La generación de bandas diferenciadas en la inmunotransferencia respalda la idea de que los anticuerpos se unen a vesículas de la membrana externa utilizando sus dominios de unión al antígeno (Fab) específicos.

Ejemplo 2: Inhibición de la adhesión bacteriana a las células epiteliales.

Para fundamentar aún más el efecto antimicrobiano de los preparados de inmunoglobulinas de los autores, se estudió si los preparados de inmunoglobulinas eran eficaces para inhibir la adhesión de *M. catarrhalis* a la línea celular epitelial faríngea Detroit 562.

Se midió la capacidad de *M. catarrhalis* para adherirse a las células epiteliales humanas *in vitro* tal como se ha descrito previamente (Aebi C *et al.* (1998) *Infect Immun* 66: 3113-9) con las siguientes modificaciones. Se cultivaron durante toda la noche células Detroit 562 (~3x10⁵ células por pocillo) hasta conseguir una monocapa confluyente en placas de cultivo tisular de 24 pocillos en MEM complementado con un 0.1% de FCS pero sin anticuerpos, seguido por tres lavados en MEM. Las bacterias se cultivaron durante toda la noche y se ajustaron a las multiplicidades de infección (MOI, por sus siglas en inglés) apropiadas. Se añadieron bacterias vivas a los pocillos en MEM sin complemento de FCS con las concentraciones de inmunoglobulinas apropiadas (preparadas tal como se describe en el párrafo 1.2 anterior) o controles (por ejemplo, prolina para los ensayos con IgG), pero sin antibióticos, se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm y posteriormente se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Los pocillos se lavaron después 5 veces en MEM, se tripsinizaron y las suspensiones se cultivaron cuantitativamente para determinar el número de bacterias adherentes. Se utilizó la cepa O35E.1 (es decir, un mutante con una inactivación génica de la adhesina *uspA1* isogénica generado mediante reemplazo alélico (Aebi C *et al.* (1998) *Infect Immun* 66: 3113-9)) como control positivo (es decir, inhibición de la adherencia). Los datos se expresaron como la proporción de bacterias del inóculo original que se adhieren a las células epiteliales. Cada ensayo se realizó por triplicado y se realizaron al menos tres experimentos, lo que dio como resultado al menos nueve puntos de datos por condición investigada. Se determinó la viabilidad celular morfológicamente, mediante exclusión por azul de tripano y un ensayo de LDH comercial (BioChain Institute, Inc., Hayward, CA).

Tanto IgA F4 (Fig. 3) como IgA F5 (Fig. 4) inhibieron significativamente la adherencia en concentraciones de 5 mg/mL. La adherencia de los controles positivos O35.1 y O35.1 complementado con 5 mg/mL de IgA fue significativamente menor. La inhibición de la adherencia por parte de IgG plasmática humana combinada fue de manera global significativa, pero ninguna de las diferencias entre columnas alcanzó significación estadística, aunque la Figura 5 sugiere un efecto inhibitor dependiente de la concentración de IgG. La fracción IgM F5A, por otra parte, demostró un marcado efecto inhibitor de la adherencia tal como se muestra en la Figura 6.

Se observó que IgA F4 e IgA F5 inhibieron significativamente la adherencia a las células Detroit con una concentración de 5 mg/mL (remítase a la Fig. 3 y Fig. 4). Aparentemente hubo una curva de dosis-efecto. La adherencia de las cepas O35.1 de control positivo, un mutante isogénico que carece de la expresión de la adhesina principal *UspA1*, también fue significativamente menor (no se indica la significación). Estas observaciones indican que IgA plasmática es (con una concentración aproximadamente un log₁₀ superior a las concentraciones en saliva fisiológica) capaz de inhibir la unión de *M. catarrhalis* a las células epiteliales faríngeas *in vitro*. Estos datos respaldan su potencial como un anticuerpo neutralizante “de la mucosa” para prevenir los efectos proinflamatorios de los componentes de la superficie bacteriana (por ejemplo, OMP, LOS). Se han documentado observaciones similares para IgM F5A plasmática purificada (Fig. 6). También se observó una tendencia análoga (Fig. 5) para IgG plasmática (Privigen®) aunque no se obtuvieron significaciones estadísticas. Cabe mencionar que IgG (así como también IgM) unida activa notablemente el complemento humano y que la unión bacteriana con una posterior aniquilación u opsonización puede no ser deseable en la prevención de la mucositis. Sin embargo, no se sabe si el complemento está activo en la cavidad humana ni la medida en la que lo está.

40 **Ejemplo 3: Inhibición de la invasión bacteriana de células epiteliales por inmunoglobulinas**

Tal como se ha mostrado previamente (Spaniol V *et al.* (2008) *Microbes Infect* 10: 3-11), *M. catarrhalis* es capaz de penetrar en las células epiteliales e incluso ubicarse en tejido blando faríngeo submucoso *in vivo* en niños y adultos jóvenes (Heiniger N *et al.* (2007) *J Infect Dis* 196:1080-7). Por lo tanto, los autores investigaron el potencial de las inmunoglobulinas humanas para inhibir la penetración en las células epiteliales faríngeas *in vitro* para demostrar aún más el potencial beneficio de los preparados de inmunoglobulinas.

Se estimó la invasión bacteriana utilizando un ensayo de protección de gentamicina tal como se ha descrito previamente (Spaniol V *et al.* (2008) *Microbes Infect* 10: 3-11) con las siguientes modificaciones. Se prepararon las células en medio sin antibióticos. Después de lavar, se añadieron bacterias con una MOI de 30 junto con la concentración indicada de cada inmunoglobulina preparada tal como se ha descrito en el párrafo 1.2 anteriormente, se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm y se incubó durante 3 h a 37 °C en un 5% de CO₂. Para determinar el número de bacterias intracelulares, se lavó la monocapa infectada tres veces en PBS y se trató con sulfato de gentamicina (200 µg/mL) durante 2 h a 37 °C. Después de lavar, se desprendieron las células de la superficie plástica mediante tratamiento con 0.025% de tripsina-EDTA, se lisaron mediante la adición de un 1% de saponina y se diluyeron en serie en PBS para el cultivo bacteriano cuantitativo. Se calcularon las relaciones de invasión dividiendo el número de cfu recuperadas tras la exposición a gentamicina por el número de cfu inoculadas.

La Figura 7 demuestra que IgA F4 con una concentración de 10 mg/mL inhibió significativamente la penetración en células faríngeas Detroit 562 en comparación con 0.1 mg/mL. La comparación de 10 mg/mL con el control negativo (MEM-PBS) no consiguió alcanzar significación. De manera similar, 10 mg/mL de IgG plasmática combinada

humana (Privigen®) inhibieron significativamente la invasión en comparación con el control negativo MEM-PBS. Esto también fue cierto para IgM F5 plasmática, que a 5 mg/mL demostró una inhibición significativa de la invasión en comparación con el control de MEM-PBS y la concentración de IgG más baja de 0.1 mg/mL. Como medida de la dispersión, en las figuras 7 a 9 los autores utilizaron el error estándar de la media (EEM). Los autores también se han visto forzados a abstenerse de presentar controles “positivos” que fueran totalmente incapaces de penetrar en células Detroit, debido a que no se disponía de tales bacterias.

Recientemente se ha observado que más y más patógenos extracelulares clásicos son capaces de penetrar o experimentar transcitosis a través de la capa celular epitelial de la mucosa, por ejemplo, *Haemophilus influenzae* no tipable (Eldika, N y Sethi S (2006) *Curr Opin Pulm Med* 12: 118-24), *Staphylococcus aureus* (Que YA *et al.* (2005) *J Exp Med* 201: 1627-35), etc. La persistencia intracelular puede ser un medio de evadir la inmunidad de la mucosa, de acceder al subepitelio del hospedador y, en última estancia, al espacio vascular.

Esto puede ser de particular relevancia en pacientes con neutropenia febril y mucositis. Los autores midieron la inhibición mediada por inmunoglobulinas de la penetración epitelial utilizando un ensayo de protección de gentamicina consolidado y observaron que los tres isotipos fueron capaces de inhibir la penetración en células Detroit. En los casos de IgA F4 (Fig. 7) e IgM F5A (Fig. 9), se observó una inhibición significativa con 10 mg/mL y 5 mg/mL, respectivamente. Nuevamente, se observó una tendencia similar, aunque no estadísticamente significativa, para IgG plasmática (Fig. 8).

Ejemplo 4: Modulación de la liberación de citosinas/quimiocinas epiteliales por inmunoglobulinas

Para mostrar el potencial de los efectos antiinflamatorios de las inmunoglobulinas, se investigó si el preparado de inmunoglobulinas tenía algún efecto sobre la liberación de citocinas/quimiocinas por las células epiteliales.

Se prepararon monocapas de células Detroit y se estimularon con una concentración diferente de OMP de *M. catarrhalis* (remítase al Ejemplo 1.3 para la preparación de OMP) en presencia de concentraciones crecientes de IgA F4. Los controles negativos estuvieron constituidos por medio con o sin OMP. Se recogieron los sobrenadantes individuales a un tiempo de 0 y 24 horas después de la estimulación y después se mantuvieron a -80 °C hasta el análisis. En el presente experimento, se incubaron las muestras durante 16 horas durante toda la noche antes de la detección. Como una solución matricial, los autores utilizaron medio de cultivo celular RPMI-1640 (Sigma, R8758) con un 0.1% de FCS. Después de preparar las muestras, se adquirieron los datos con un analizador Bioplex 200 (BioRad). Se realizó la preparación de las células Detroit, exposición a diversas concentraciones de inmunoglobulinas y OMP en el Instituto de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Berna. La determinación de las citocinas/quimiocinas se llevó a cabo en CSL, Behring, Berna.

A tiempo 0, las células Detroit recibieron un medio fresco complementado con o sin OMP y diferentes concentraciones de IgA F4. Por esta razón, y tal como se muestra en la Figura 10 A, B, C apenas se pudo detectar ninguna citocina en este momento en los sobrenadantes. A las 24 h, sin ninguna OMP, las células Detroit secretaron niveles detectables de MCP-1, IL-8 e IL-6 (Fig. 10A, B, C). MCP-1 es una citocina clave que regula la reclutación de monocitos/macrófagos. Está implicada en muchas enfermedades (Deshmane SL *et al.* (2009) *J. Int. & Cyt. Res.* 29, 6, 313-326). IL-8, o factor quimiotáctico de neutrófilos, es una quimiocina que recluta neutrófilos al tejido. También se asocia a la inflamación en la cavidad bucal (Ertugrul AS *et al.* (2013) *J Periodont Res*; 48: 44-51). Por último, también IL-6 es un importante mediador de la inflamación y se ha mostrado su inducción en fibroblastos irradiados (Brach MA *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:8466-8472; Rincon M (2012) *Trends Immunol.* 33 (11) 571-577). De manera importante, la adición de OMP al medio incrementó la producción de MCP-1, IL-8 e IL-6 aproximadamente 10, 3 y 7 veces, respectivamente. Además, aunque las cantidades bajas de IgA F4 apenas tuvieron ningún efecto en la producción de quimiocinas/citocinas inducida por OMP, 10 mg/mL de IgA redujeron de manera llamativa la secreción de MCP-1 y, en menor medida, de IL-8 e IL-6.

Para respaldar estos resultados, los autores se propusieron estudiar la actividad de IgA F4 en líneas celulares adicionales. El tejido del suelo de la boca representa uno de los tejidos que sufren lesiones durante el transcurso de la mucositis oral. Los inventores detectaron una nueva línea celular, H376 (carcinoma de células escamosas oral humano; HPACC 06092005), que se origina en el suelo de la boca. Además de H376, los autores eligieron estudiar fibroblastos gingivales (línea celular HGF-1; ATCC® CRL-2014™) ya que están situados bajo las células epiteliales bucales y percibirán la inflamación en el transcurso de la mucositis oral.

En los siguientes experimentos, los autores analizaron el perfil de citocinas de las células H376 y HGF-1.

Se prepararon monocapas de células en presencia de 2 concentraciones de IgA F4 (5 y 10 mg/mL preparadas en MEM). Los controles negativos estuvieron constituidos solo por medio (medio de cultivo celular MEM puro, Life Technologies, 51200-046). Se recogieron los sobrenadantes individuales a las 24 horas. Se estimularon las células HGF-1 con citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1 β y TNF α recombinantes, ambos con una concentración de 50 ng/mL; de Milteni (130-093-893) y Peprotech (300-01A), respectivamente) que se saben que estimulan los fibroblastos. Después de la estimulación, los sobrenadantes se mantuvieron a -80 °C hasta el análisis. Como solución matricial los autores utilizaron MEM. Después de preparar las muestras, se adquirieron los datos con un

analizador Bioplex 200 (BioRad).

Las células H376 secretaron IP-10, que es una proteína inducida por IFN- γ asociada con la inflamación (Liu M *et al.* (2011) *Cytokine growth Factor Rev.* 22(3), 121-130), y G-CSF, que representa un mediador inflamatorio capaz de reclutar neutrófilos a los sitios inflamatorios (Suzuki S (2002) *Blood* 99: 1863-1865) (Fig. 11A, B). En la Figura 11 A y B los autores muestran que el tratamiento de las células H376 con 5 mg/mL de IgA redujo notablemente la producción tanto de IP-10 como de G-CSF en aproximadamente un 50%. El incremento de la concentración de IgA hasta 10 mg/mL no redujo adicionalmente la producción de G-CSF pero redujo la producción de IP-10 ligeramente mejor que con IgA con una concentración de 5 mg/mL (Fig. 11A,B). Las células H376 son células tumorales y pueden tener un fenotipo activado. Los autores no pueden descartar que los niveles tanto de IP-10 como de G-CSF puede que no sean tan elevados como en las células epiteliales bucales primarias.

HGF-1 son fibroblastos gingivales. No producen ninguna IP-10 en el estado estacionario (Fig. 11C). Sin embargo, hubo una clara inducción de la producción de IP-10 cuando se aplicaron moléculas inflamatorias tales como IL-1 β y TNF- α en su medio (MEM puro). TNF α fue más potente en la inducción de IP-10 que IL-1 β , con concentraciones equivalentes. En ambas condiciones, la adición de IgA en el momento de la estimulación redujo notablemente la producción de IP-10 mostrando la concentración más elevada de IgA F4 la reducción más marcada. No obstante, IgA F4 con una concentración de 5 mg/mL mostró un efecto inmunosupresor muy similar (Fig. 11C).

En resumen, los datos de los autores son los primeros que muestran que IgA F4 ejerce un efecto inmunosupresor en células que no son células mieloides (por ejemplo, células epiteliales). Esta es una información muy valiosa ya que durante el transcurso de la mucositis oral, las quimiocinas y citocinas proinflamatorias experimentarán un aumento regulado en respuesta a la radiación ionizante y/o colonización bacteriana por células epiteliales y fibroblastos. Estos resultados indican que durante el transcurso de la mucositis oral, IgA puede potencialmente dirigir su efecto inmunosupresor a una amplia gama de subconjuntos celulares (por ejemplo, neutrófilos, macrófagos, células epiteliales, etc.).

Ejemplo 5: Inhibición de la adherencia, invasión y modulación de la liberación de citocinas/quimiocinas epiteliales inducidas por bacterias que no son *M. catarrhalis* por inmunoglobulinas

En experimentos similares, a los descritos en los Ejemplos 1-4, se investigaron otros microorganismos tales como bacterias que no son *M. catarrhalis* u hongos. Estos incluyen, sin carácter limitante, especies patógenas y patógenas oportunistas tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, grupo de *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumonia*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter aerogenes*, *Haemophilus influenza*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mitis*, *Candida albicans*, y muchas especies de bacterias anaeróbicas. Se obtuvieron resultados similares a los descritos en los Ejemplos 1-4: los preparados de IgA contienen anticuerpos específicos contra las bacterias u hongos mencionados anteriormente; se inhiben la adherencia e invasión de las células epiteliales; se inhibe la respuesta de citocinas inflamatorias. Se obtienen resultados similares con otras líneas celulares epiteliales, representativas del recubrimiento de la mucosa del tubo gastrointestinal y del colon.

Ejemplo 6: Prevención de la mucositis en un modelo en animales

Se estudiaron preparados de inmunoglobulinas formulados de manera apropiada en modelos en animales de mucositis oral. La inmunoglobulina se aplica de manera profiláctica y tras la inducción de la mucositis por quimio- y radioterapia simultáneas (CCRT, por sus siglas en inglés) en un modelo en ratones transgénicos CD-89 adaptado de Ryu *at al.* (*J. Radiat. Res.*, 51, 595-601, 2010). Los autores miden los efectos del tratamiento con inmunoglobulina sobre la extensión y gravedad de la mucositis oral, pero también sobre factores asociados con la curación de heridas y la resolución del daño tisular resultante de CCRT. Son indicadores concretos de la gravedad de la mucositis oral la pérdida de peso corporal, atrofia de la lengua y mucosa bucal (grosor epitelial). Además, se evalúan los efectos del tratamiento midiendo el grosor de las capas epiteliales, número de células basales en la mucosa, cuantificación histológica del marcador de la proliferación KI-67, transcritos de ARNm (mediante hibridación *in situ* y RT-PCR de las muestras tisulares) y expresión proteica de factores de crecimiento como KGF, factor de crecimiento epitelial, factores de crecimiento de fibrocitos, factores de crecimiento endoteliales vasculares A, etc. Tales análisis proporcionarán información sobre la reducción modulada de las cascadas proinflamatorias intracelulares como resultado de la exclusión inmunitaria y potencialmente también debido a la interacción directa de IgA con células que expresan CD89. Los ratones tratados con IgA pierden menos peso corporal y su lengua y mucosa bucal se ve afectada de manera menos grave que en los animales no tratados. Los ratones tratados con IgA de tipo secretor están aún mejor protegidos.

Como alternativa, se utilizan modelos en hámster de mucositis oral, similares a los descritos en Watkins *et al.* (*Oral Dis* 2010, 16:655-660). Se proporcionan preparados de IgA formulados de manera apropiada (o soluciones de vehículo como control) de manera profiláctica (por ejemplo, comenzando en el día -3) tres veces al día a hámsters sirios dorados durante toda la duración del estudio hasta el día 28. En un modelo de mucositis inducida por una única radiación, en el día 0 se irradia un abazón bucal evertido (40 Gy), el otro abazón se deja sin tratamiento a

modo de control. Como alternativa, en un modelo de mucositis inducida por radiación fraccionada, se aplica una dosis acumulada de 60 Gy, repartida en ocho fracciones de 7.5 Gy tal como se describe en (Watkins, *Oral Dis* 2010, 16:655-660). En otro modelo más de una combinación de cisplatino y mucositis inducida por una única radiación, se inducen la enfermedad mediante una combinación de cisplatino (5 mg/kg) y radiación de 35 Gy en el día 0. Se realiza la evaluación clínica de la mucositis oral y el control del peso corporal a diario, comenzando en el Día 6 hasta el final del estudio, normalmente en el Día 28. El sistema de calificación se describe en (Watkins *Oral Dis*, 2010 16:655-660). Además, se recogen las muestras de tejido y plasma y se procesan de manera adecuada a lo largo del estudio para realizar análisis histológicos, determinación de los marcadores inflamatorios en el plasma y estudios de expresión génica de varios tejidos. El animal no tratado/tratado con vehículo desarrolla mucositis oral, máximos de la enfermedad alrededor del día 16-18, la curación espontánea, que se evidencia por una regresión de la mucositis, comienza alrededor del día 18-20. Los animales tratados con IgA tienen unas calificaciones de mucositis significativamente menores en comparación con los animales de control y pierden menos peso, acompañado esto por hallazgos histológicos menos graves y niveles menores de marcadores inflamatorios (incluidos, sin carácter limitante, citocinas y quimiocinas inflamatorias). La reducción de la inflamación y la estimulación de la curación de heridas se confirma a nivel de la expresión de ARNm mediante técnicas de análisis de la expresión génica. El tratamiento con IgA de tipo secretor es aún más eficaz.

Ejemplo 7: Inhibición de la adherencia de patógenos oportunistas a las células epiteliales bucales

Para corroborar y consolidar aún más sus datos sobre el efecto antimicrobiano de sus preparados de inmunoglobulinas presentadas en el ejemplo 2, los autores estudiaron la capacidad de IgA para interferir con la adherencia bacteriana a células epiteliales H376.

La microflora bucal está compuesta por una gran variedad de cepas bacterianas con cierta predominancia de *Firmicutes phylum* (The Human Microbiome Project Consortium (2012) *Nature* 486:207-214) (Dewhirst FE (2010) *J. Bacteriol* 192:5002-5017). Significativamente, *Streptococcus pneumoniae* no encapsulada y *Streptococcus mitis* (ambas procedentes de *Firmicutes phylum*) están muy próximas desde un punto de vista genético. Se sabe que *S. mitis* representa el principal patógeno oportunista oral y puede, potencialmente, dar lugar a una infección cuando se rompe la barrera epitelial como puede suceder normalmente en pacientes con mucositis oral. *S. pneumoniae* no encapsulada se adhiere bien al epitelio y puede provocar infecciones en la mucosa, incluida la conjuntivitis, pero no una enfermedad invasiva. Por lo tanto, tanto *S. pneumoniae* R6 como *S. mitis* son organismos modelo útiles para estudiar la interacción entre bacterias y el epitelio de la mucosa oral en el contexto de este proyecto.

La capacidad de los aislados bacterianos de adherirse a las células epiteliales humanas *in vitro* se midió tal como se ha descrito previamente en el ejemplo 2 y en la bibliografía (Aebi C *et al.* (1998) *Infect Immun* 66: 3113-9) con las siguientes modificaciones. Se cultivaron células H376 (~3x10⁵ células por pocillo) durante toda la noche hasta conseguir una monocapa confluyente en placas de cultivo tisular de 24 pocillos en MEM complementado con un 0.1% de FCS pero sin anticuerpos, seguido por tres lavados en MEM. Las bacterias se cultivaron durante toda la noche y se ajustaron a las multiplicidades de infección (MOI) apropiadas. Se añadieron bacterias vivas a los pocillos en MEM sin complemento de FCS con las concentraciones de inmunoglobulinas apropiadas (preparadas tal como se describe en el párrafo 1.2 anterior) o controles (por ejemplo, prolina para los ensayos con IgG), pero sin antibióticos, se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm y posteriormente se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Los pocillos se lavaron después 5 veces en MEM, se tripsinizaron y las suspensiones se cultivaron cuantitativamente para determinar el número de bacterias adherentes. Los datos se expresaron como la proporción de bacterias del inóculo original que se adhieren a las células epiteliales. Cada ensayo se realizó por triplicado y se realizaron al menos tres experimentos, lo que dio como resultado al menos nueve puntos de datos por condición investigada. Se determinó la viabilidad celular morfológicamente, mediante exclusión por azul de tripano y un ensayo de LDH comercial (BioChain Institute, Inc., Hayward, CA).

Tal como se muestra en la Fig. 12A, *S. pneumoniae* R6 se adhirió muy bien a las células H376 que se originan en el suelo de la boca. Después de lavar, más de un 60% de las bacterias seguían adhiriéndose a las células. Significativamente, la adición de 2 mg/mL de IgA F4 fue suficiente para bloquear de manera llamativa la adherencia de *S. pneumoniae* R6 a las células epiteliales. Aproximadamente, se pudo evitar que un 75% de las bacterias se adhiriera en las células. Dosis crecientes de IgA mostraron una inhibición ligeramente mayor de la adherencia bacteriana. En la Fig. 12B, se estudió la adherencia de *S. mitis* a H376. Los autores observaron que *S. mitis* se une a las células epiteliales, en menor medida que *S. pneumoniae* R6. Sin embargo, IgA F4 inhibió claramente la adherencia de *S. mitis* con un efecto máximo con 5 mg/mL. Por lo tanto, la administración de IgA F4 a la cavidad bucal de pacientes que muestran síntomas de mucositis oral puede proteger el epitelio bucal de la colonización por patógenos oportunistas.

Ejemplo 8: IgA protege las células epiteliales de la citotoxicidad inducida por radiación ionizante y

La radioterapia utilizada para tratar pacientes que portan tumores actúa sobre las células proliferativas (células tumorales, por ejemplo). Al generar roturas en el ADN y especies de oxígeno reactivas, las radiaciones ionizantes y inducen por lo general la muerte de las células tumorales. Aunque se cree que las células del epitelio bucal son más

resistentes a la irradiación debido a su bajo recambio, irradiaciones repetidas aún puede inducir citotoxicidad en estas células. Para investigar si IgA tiene un impacto en la supervivencia celular después de la radiación ionizante, los autores irradiaron H376 y midieron la citotoxicidad celular después de 24 h.

5 Tal como se representa en la Figura 13A, se sembraron 3×10^4 células H376/pocillo (placa de 96 pocillos) en MEM (80 μ L) y se mantuvieron dos horas a 37 °C. A continuación, se añadieron IgA F4 (5 o 10 mg/mL) y/o MEM a los pocillos para alcanzar un volumen final de 100 μ L (triplicados). Un día más tarde, se irradiaron las células con 4 Gy y se volvieron a poner a 37 °C. 24 h después de la irradiación, se evaluó la citotoxicidad celular utilizando el kit de ensayo de citotoxicidad CytoTox-Glo™ (Promega, G9291). Este kit mide la cantidad de proteasas intracelulares liberadas durante el transcurso de la muerte celular.

10 Tal como se muestra en la Figura 13B, más de un 30% de H376 murieron después de recibir radiación ionizante. El tratamiento profiláctico de las células H376 con IgA F4 redujo esta citotoxicidad en una manera dependiente de la dosis. Con 10 mg/mL de IgA se inhibió la muerte celular a las 24 h en casi un 50% y con 5 mg/mL de IgA en casi un 30%. Por lo tanto, la adición de IgA a las células epiteliales proporcionó una ventaja de supervivencia y puede reducir los efectos de la irradiación repetida en los epitelios de los pacientes.

15 **Ejemplo 9: Efecto beneficioso en la reepitelización de las heridas**

Aunque el control de la colonización bacteriana y las señales inflamatorias durante la mucositis oral resulta relevante, se está volviendo evidente que la reducción de los síntomas de la mucositis oral requiere un cierre rápido de la herida después de la ulceración del epitelio bucal. KGF desempeña una función importante en la reepitelización de las heridas. Esta es una de las razones por las que KGF es en la actualidad uno de los pocos fármacos autorizados para uso en el tratamiento de la mucositis oral. Para delinear aún más la función potencial de IgA durante la mucositis oral, los autores estudiaron IgA en epitelios con heridas. Para reproducir el posible efecto perjudicial de la irradiación en las células epiteliales *in vitro*, irradiaron monocapas de células antes de utilizarlas en un ensayo de arañazo.

20 El principal ensayo utilizado para estudiar la curación de heridas es el ensayo de arañazo común. Consiste en realizar un arañazo en una monocapa de células y capturar imágenes a lo largo del tiempo con el fin de medir el cierre de la herida artificial. Tal como se presenta en la Figura 14A, los autores sembraron $\sim 3 \times 10^5$ células H376 por pocillo (placa de 24 pocillos) en MEM (500 μ L de volumen final) y las placas se mantuvieron a 37 °C durante 2h. A continuación, se añadieron inmunoglobulinas (por ejemplo, IgA o IgG o medio de control) a los pocillos y las placas se colocaron durante veinticuatro horas más a 37 °C. En este paso, se irradiaron las placas con 2 Gy, 4 Gy o se dejaron sin tratar y se volvieron a poner a 37 °C. 24 h más tarde, se realizó un arañazo con una punta P1000 a lo largo de la monocapa de células de cada pocillo. Para prevenir que las células arañadas cayeran en el hueco artificial, se eliminó el medio, se lavó la monocapa de células una vez con MEM y después se añadió MEM complementado o no con inmunoglobulinas a los pocillos. Se capturaron imágenes en diferentes puntos temporales utilizando un microscopio y se midió el tamaño de la brecha. Un 100% de reepitelización de la herida corresponde a una recuperación total de la herida artificial.

25 Se estudiaron dos dosis de IgA F4 (10 mg/mL y 5 mg/mL) mientras que se utilizaron 10 mg/mL de IgG. Resulta interesante que, en el estado estacionario, IgA mostrara un efecto ligeramente positivo en el cierre de la brecha artificial (Fig. 14B). Por el contrario, IgG parece ralentizar el cierre de la herida. Cuando se arañó la monocapa de células irradiada, la función de IgA se volvió más clara (Fig. 14C y D). IgA F4 mantuvo la migración y división de células H376 irradiadas mientras que las células irradiadas no tratadas no cubrieron la brecha artificial a la misma velocidad. Además, el efecto de IgA es más acusado cuando las células se irradiaron con 4 Gy. Se observó un efecto negativo de IgG en las células epiteliales cuando las células se irradiaron con 2 Gy y 4 Gy (Fig. 14C, D).

35 **Ejemplo 10: Unión específica de IgA a las células epiteliales**

40 Para recopilar información sobre el posible mecanismo por el cual IgA regula la función de las células epiteliales durante el transcurso de la estimulación bacteriana y la reepitelización de las heridas, los autores analizaron la expresión en la superficie celular de los receptores de IgA tanto en células epiteliales Detroit 562 como H376.

45 De varios receptores se ha descrito que se unen a IgA. Estos son CD89, CD71 (receptor de transferrina), ASGP-R, FCAMR (Fca/mR, CD351) y plgR (CD300e) (Monteiro *et al.* (2003) *Annu. Rev. Immunol.* 21:177-204). CD89 se expresa en las células mieloides mientras que ASGP-R, FCAMR y plgR están presentes en los hepatocitos, linfocitos B y macrófagos, y en las células epiteliales intestinales respectivamente. Únicamente CD89 se une a IgA con una especificidad elevada.

50 Debido a que muchos tipos celulares necesitan la captación de hierro debida a la transferrina que está impulsada por la unión de la transferrina a su receptor (por ejemplo, CD71), CD71 está, por lo tanto, potencialmente expresado en muchos tipos celulares excepto en las células sumamente diferenciadas (Pomka P *et al.* (1999) *IJBCB* 31, 1111-1137). Sin embargo, su nivel varía considerablemente de una célula a otra. Hasta la fecha, se ha mostrado que CD71 se une tanto a IgA monomérica como IgA secretora (Moura *et al.* (2001) *J. Exp. Med.* 194, 4, 417-425). Por lo

tanto, es una posible diana para IgA en las células epiteliales bucales.

Para controlar la expresión de este receptor, los autores desprendieron con cuidado células H376 y Detroit 562 lavadas con PBS 1X con Accutase (eBioscience) durante 10 minutos a 37 °C, las lavaron con PBS 1X y las tiñeron en PBS 1X en hielo durante 30 minutos utilizando un anticuerpo anti-(CD71 humano) (BD Biosciences, clon A59). Se utilizó un anticuerpo de control del isotipo para evaluar el nivel de fluorescencia de fondo. Se utilizó CD89, que únicamente está expresado en las células mieloides, como control negativo (BD Biosciences, clon M-A712). Después de dos pasos de lavado, se procesaron las muestras en un citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson).

Tal como se muestra en la Figura 15, los autores observaron que tanto las células epiteliales H376 como Detroit 562 expresaron claramente el receptor de la transferrina. Por el contrario, y como se esperaba, no se detectó CD89 en las células epiteliales.

Ejemplo 11: Los preparados de IgA F4 no reaccionan con TNF α

En los últimos años, se ha incrementado notablemente la generación de inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) para tener como diana y/o inhibir proteínas clave responsables de la inflamación o que fomentan el desarrollo tumoral. Tanto en las enfermedades crónicas como en las enfermedades autoinmunitarias, se ha demostrado que los anticuerpos anti-TNF α específicos reducen la inflamación en los pacientes tratados.

Tal como se muestra en el ejemplo 4 (Fig. 10 y 11), IgA disminuyó de manera regulada la producción de moléculas proinflamatorias por parte de las células epiteliales. Para descartar la participación de la actividad anti-TNF en los efectos antiinflamatorios de IgA observados, los autores determinaron los niveles de los anticuerpos específicos para TNF α en sus preparados de IgA e IgG policlonales.

Se recubrieron las placas de 96 pocillos (placa de muestra) (Nunc Maxisorb) con una concentración de 1 μ g/mL de TNF- α en PBS pH 7.4 (50 μ L por pocillo) durante 2 h a 37 °C. A continuación, se lavaron los pocillos una vez con 300 μ L de tampón de lavado (1x PBS, 0.05% (v/v) de Tween-20) y se bloquearon con Smart Block (Candor Bioscience) durante 2 horas a 37 °C. En paralelo, se preparó una placa de control de la unión (placa blanco) que no estaba recubierta con TNF- α . Tras un paso de lavado, se diluyeron las muestras de Ig (IgA F4/IgG Privigen/Infliximab) en tampón LowCrossBuffer (LCB) (Candor Bioscience). En algunos pocillos, se añadió TNF- α libre para inhibir la unión del anticuerpo. Las muestras (100 μ L) se pipetearon en las placas y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Tras la incubación, los pocillos se lavaron tres veces y las placas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con los anticuerpos secundarios relevantes: anticuerpo policlonal de conejo anti-(IgG humana)-HRP (Dako; 0.5 μ g/mL) o anticuerpo policlonal de conejo anti-(IgA humana)-HRP (Dako; 0.5 μ g/mL) en tampón de anticuerpo (LCB). Los pocillos se lavaron cuatro veces como se hizo anteriormente y posteriormente se desarrollaron con TMB ultrasensible (Fitzgerald). La reacción se detuvo con ácido clorhídrico 1 M (Merck) y se midió la absorbancia a 450 nm con un lector multietiqueta EnVision (Perkin Elmer).

La Figura 16 demuestra que los preparados de IgG y de IgA F4 de los autores contuvieron cantidades despreciables de anticuerpos anti-TNF α . Con una concentración equivalente, IgA e IgG son respectivamente 1.2×10^6 y 1.1×10^5 veces menos reactivos respecto a TNF α que el anticuerpo anti-TNF α específico Infliximab). Por lo tanto, la actividad inmunosupresora de IgA es independiente en lo que se refiere a TNF α de la actividad anti-TNF α .

Lista de secuencias

<110> CSL Behring AG *et al.*

<120> Tratamiento

<130> A194

<150> EP2012158939.4
< 151> 09-03-2012

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
< 211> 764
< 212> PRT

ES 2 660 157 T3

< 213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Phe Val Leu Thr Cys Leu Leu Ala Val Phe Pro Ala Ile
 1 5 10 15

Ser Thr Lys Ser Pro Ile Phe Gly Pro Glu Glu Val Asn Ser Val Glu
 20 25 30

Gly Asn Ser Val Ser Ile Thr Cys Tyr Tyr Pro Pro Thr Ser Val Asn
 35 40 45

Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp Cys Arg Gln Gly Ala Arg Gly Gly Cys
 50 55 60

Ile Thr Leu Ile Ser Ser Glu Gly Tyr Val Ser Ser Lys Tyr Ala Gly
 65 70 75 80

Arg Ala Asn Leu Thr Asn Phe Pro Glu Asn Gly Thr Phe Val Val Asn
 85 90 95

Ile Ala Gln Leu Ser Gln Asp Asp Ser Gly Arg Tyr Lys Cys Gly Leu
 100 105 110

Gly Ile Asn Ser Arg Gly Leu Ser Phe Asp Val Ser Leu Glu Val Ser
 115 120 125

Gln Gly Pro Gly Leu Leu Asn Asp Thr Lys Val Tyr Thr Val Asp Leu
 130 135 140

Gly Arg Thr Val Thr Ile Asn Cys Pro Phe Lys Thr Glu Asn Ala Gln
 145 150 155 160

Lys Arg Lys Ser Leu Tyr Lys Gln Ile Gly Leu Tyr Pro Val Leu Val

ES 2 660 157 T3

Glu Glu Pro Gly Asn Gly Thr Phe Thr Val Ile Leu Asn Gln Leu Thr
 420 425 430
 Ser Arg Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Leu Thr Asn Gly Asp Thr Leu
 435 440 445
 Trp Arg Thr Thr Val Glu Ile Lys Ile Ile Glu Gly Glu Pro Asn Leu
 450 455 460
 Lys Val Pro Gly Asn Val Thr Ala Val Leu Gly Glu Thr Leu Lys Val
 465 470 475 480
 Pro Cys His Phe Pro Cys Lys Phe Ser Ser Tyr Glu Lys Tyr Trp Cys
 485 490 495
 Lys Trp Asn Asn Thr Gly Cys Gln Ala Leu Pro Ser Gln Asp Glu Gly
 500 505 510
 Pro Ser Lys Ala Phe Val Asn Cys Asp Glu Asn Ser Arg Leu Val Ser
 515 520 525
 Leu Thr Leu Asn Leu Val Thr Arg Ala Asp Glu Gly Trp Tyr Trp Cys
 530 535 540
 Gly Val Lys Gln Gly His Phe Tyr Gly Glu Thr Ala Ala Val Tyr Val
 545 550 555 560
 Ala Val Glu Glu Arg Lys Ala Ala Gly Ser Arg Asp Val Ser Leu Ala
 565 570 575
 Lys Ala Asp Ala Ala Pro Asp Glu Lys Val Leu Asp Ser Gly Phe Arg
 580 585 590
 Glu Ile Glu Asn Lys Ala Ile Gln Asp Pro Arg Leu Phe Ala Glu Glu
 595 600 605
 Lys Ala Val Ala Asp Thr Arg Asp Gln Ala Asp Gly Ser Arg Ala Ser
 610 615 620
 Val Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Gln Gly Gly Ser Ser Arg Ala Leu
 625 630 635 640
 Val Ser Thr Leu Val Pro Leu Gly Leu Val Leu Ala Val Gly Ala Val
 645 650 655
 Ala Val Gly Val Ala Arg Ala Arg His Arg Lys Asn Val Asp Arg Val
 660 665 670

ES 2 660 157 T3

Ser Ile Arg Ser Tyr Arg Thr Asp Ile Ser Met Ser Asp Phe Glu Asn
675 680 685

Ser Arg Glu Phe Gly Ala Asn Asp Asn Met Gly Ala Ser Ser Ile Thr
690 695 700

Gln Glu Thr Ser Leu Gly Gly Lys Glu Glu Phe Val Ala Thr Thr Glu
705 710 715 720

Ser Thr Thr Glu Thr Lys Glu Pro Lys Lys Ala Lys Arg Ser Ser Lys
725 730 735

Glu Glu Ala Glu Met Ala Tyr Lys Asp Phe Leu Leu Gln Ser Ser Thr
740 745 750

Val Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Pro Gln Glu Ala
755 760

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende inmunoglobulina A para su uso en un método de prevención o tratamiento de la mucositis del tubo digestivo mediante la administración tópica a la mucosa en un sujeto, donde la inmunoglobulina no se purifica a partir de un donante humano o animal inmunizado con TNF- α .
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la mucositis del tubo digestivo es mucositis oral.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la inmunoglobulina comprende IgA e IgM.
- 10 4. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la inmunoglobulina comprende IgA que contiene la cadena J.
5. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la inmunoglobulina se puede obtener a partir de la sangre o un componente de esta.
- 15 6. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que también comprende un componente secretor.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el componente secretor es componente secretor recombinante.
8. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la composición comprende IgA de tipo secretor.
- 20 9. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la composición comprende IgA de tipo secretor combinada con otra inmunoglobulina.
10. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que se formula para proporcionar un tiempo de contacto prolongado con el área de la mucosa afectada o en riesgo de verse afectada por la mucositis.
- 25 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde la formulación se selecciona entre una crema, un gel, un jarabe, una jalea, una forma sólida que se disuelve cerca de la mucosa afectada o combinaciones de estos.
12. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la administración tópica a la mucosa reduce la adherencia y/o invasión de uno o más microorganismos.
- 30 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde el microorganismo es una bacteria y/o un hongo.
14. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la aplicación tópica a la mucosa fomenta la curación de heridas de la mucosa.
- 35 15. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la aplicación tópica a la mucosa ejerce un efecto antiinflamatorio.
16. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde el efecto antiinflamatorio es
- (a) inhibición de la expresión de citocinas proinflamatorias; y/o
- (b) estimulación de la expresión de citocinas antiinflamatorias.
- 40 17. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el sujeto es un sujeto en riesgo de desarrollar mucositis del tubo digestivo tal como un paciente con cáncer que está recibiendo o que está a punto de recibir quimioterapia y/o radioterapia.
18. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, donde el sujeto en riesgo es un paciente con cáncer que desarrolló mucositis como resultado de un tratamiento previo de quimioterapia y/o radioterapia.
- 45 19. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18, donde la administración de la composición comienza cuando el recuento de neutrófilos del paciente empieza a disminuir.

20. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, donde el tratamiento se mantiene durante el periodo en el que el recuento de neutrófilos del paciente está por debajo de lo normal.
21. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la composición se administra al sujeto hasta 6 veces al día.
- 5 22. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la composición comprende un agente eficaz adicional para el tratamiento de la mucositis o donde el paciente también está utilizando otro agente tal como un colutorio antiséptico.

Figura 1

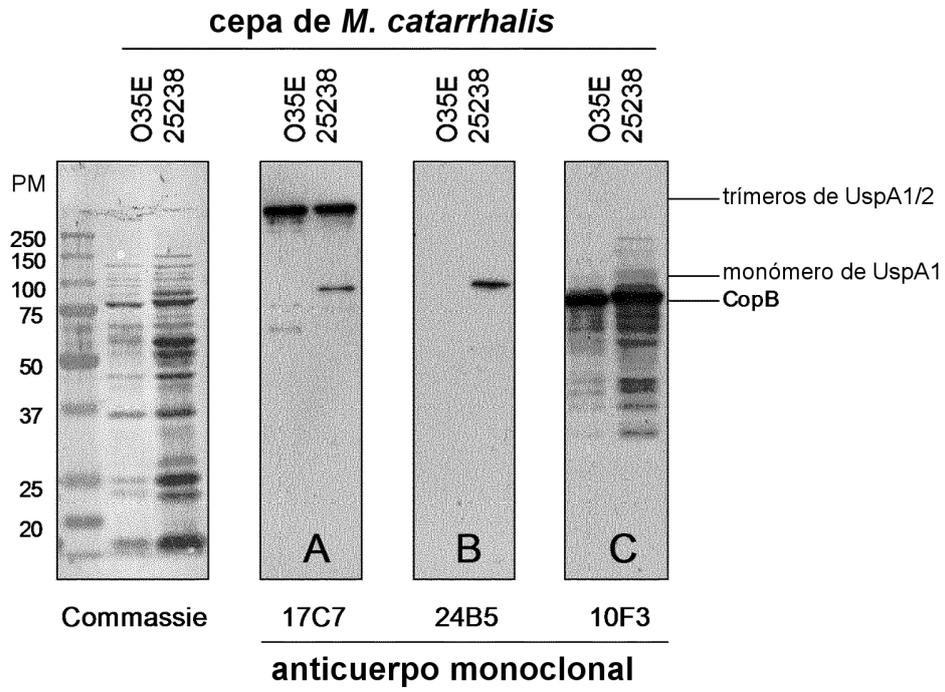


Figura 3

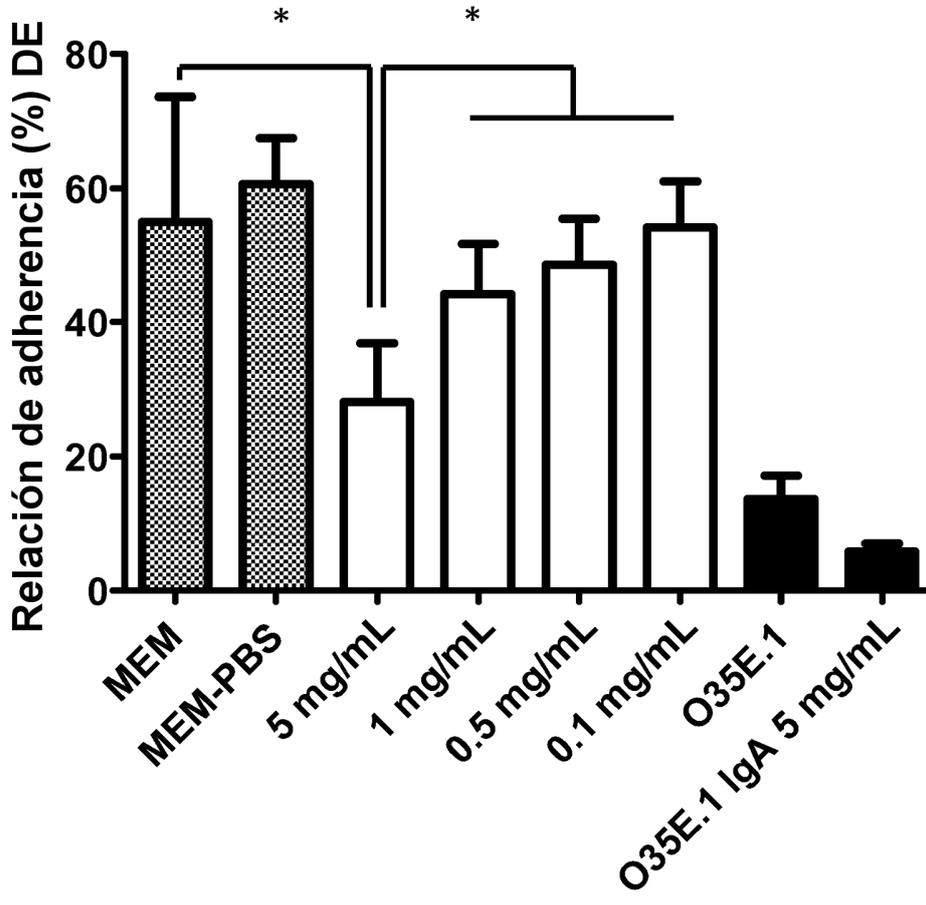


Figura 4

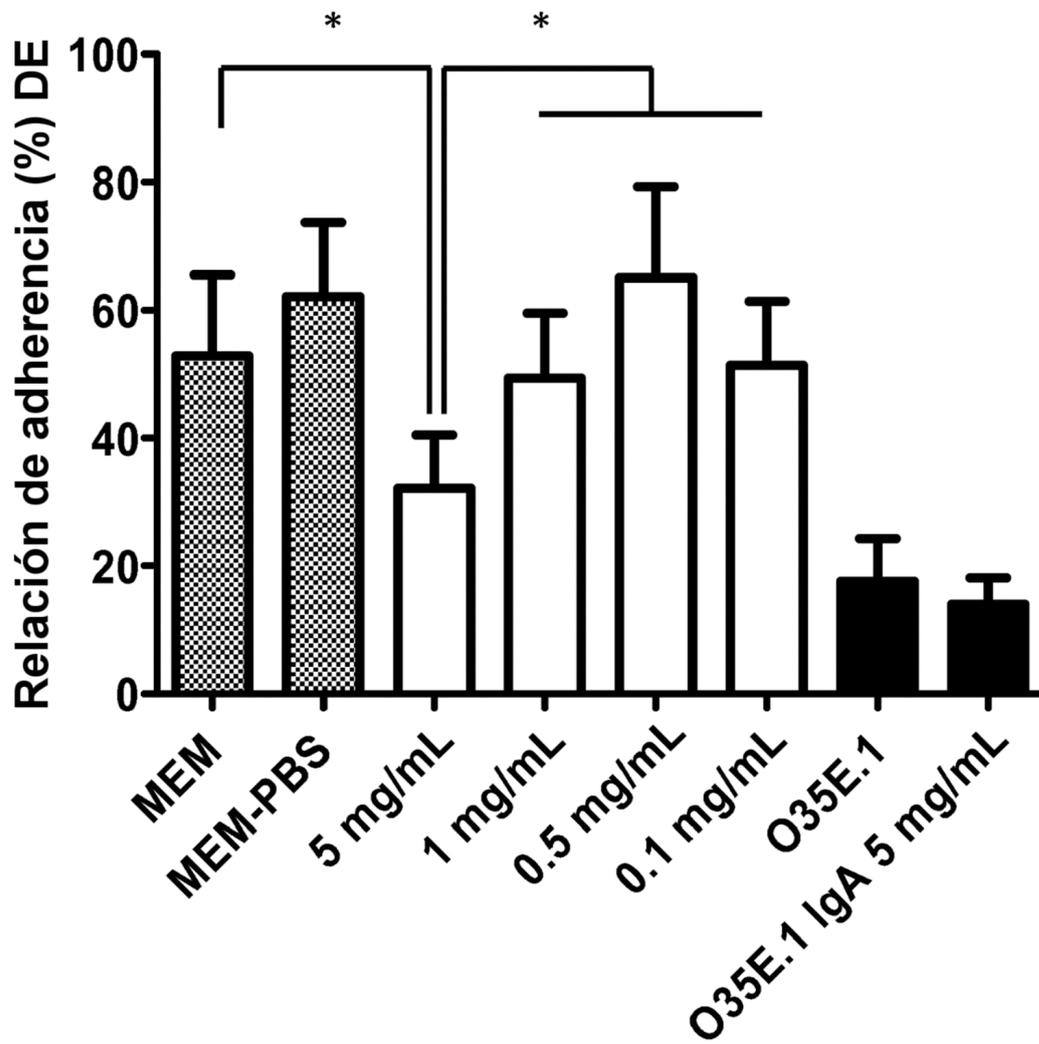


Figura 5

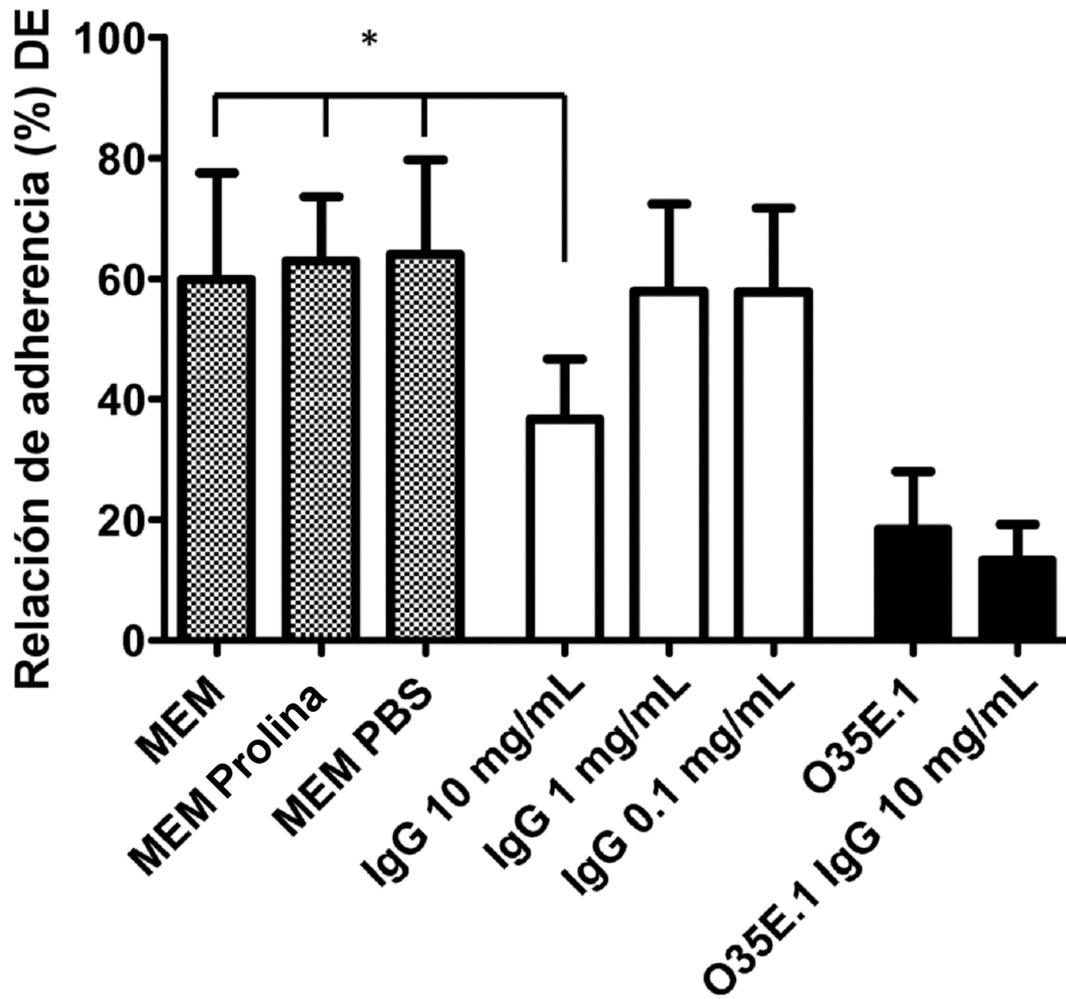


Figura 6

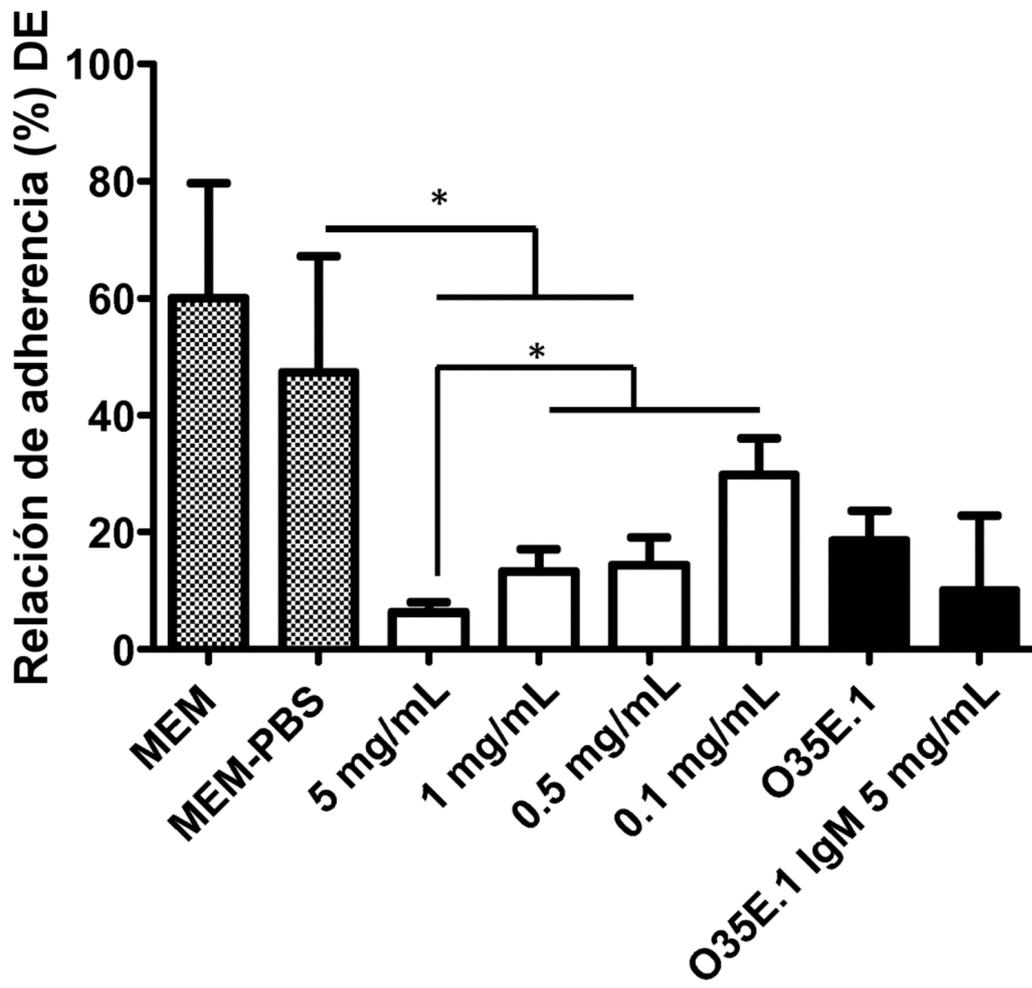


Figura 7

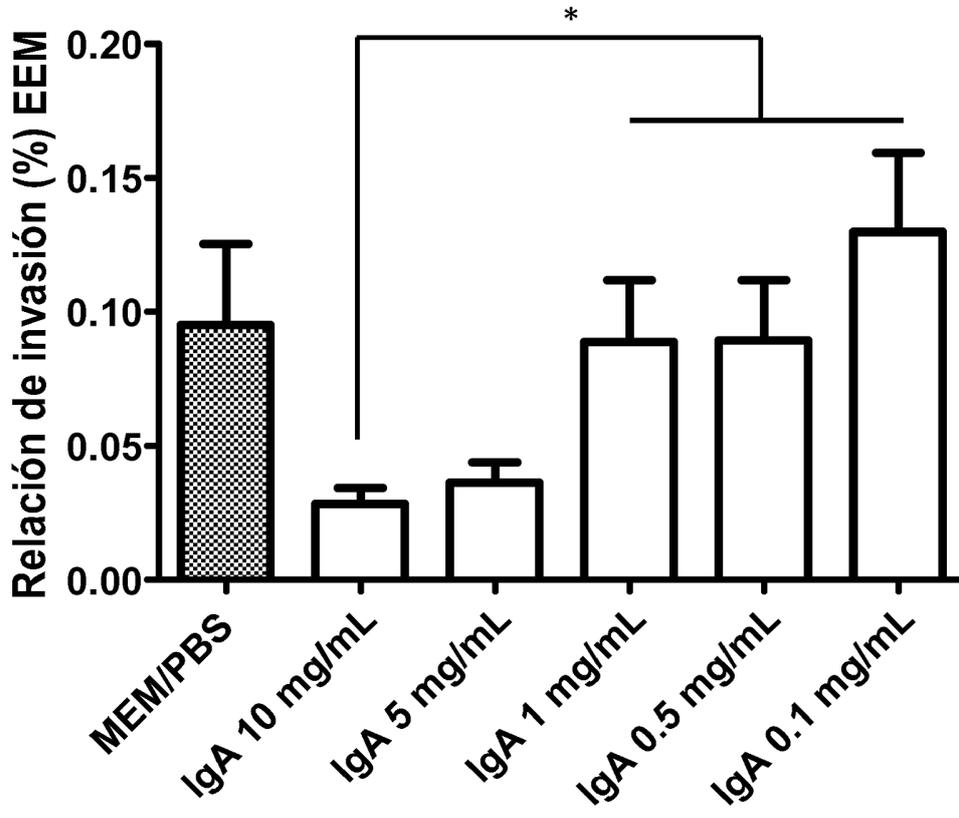


Figura 8

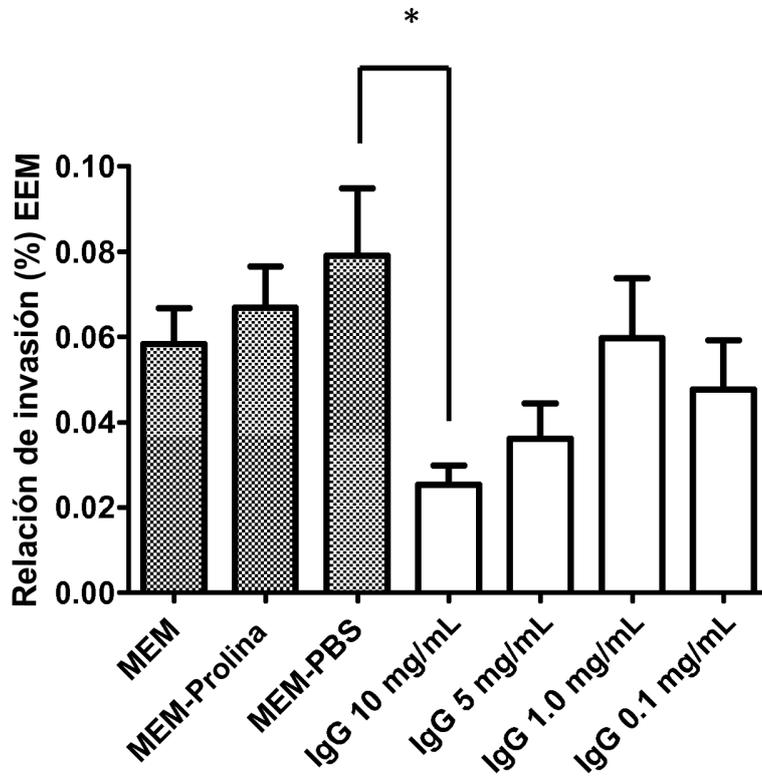


Figura 9

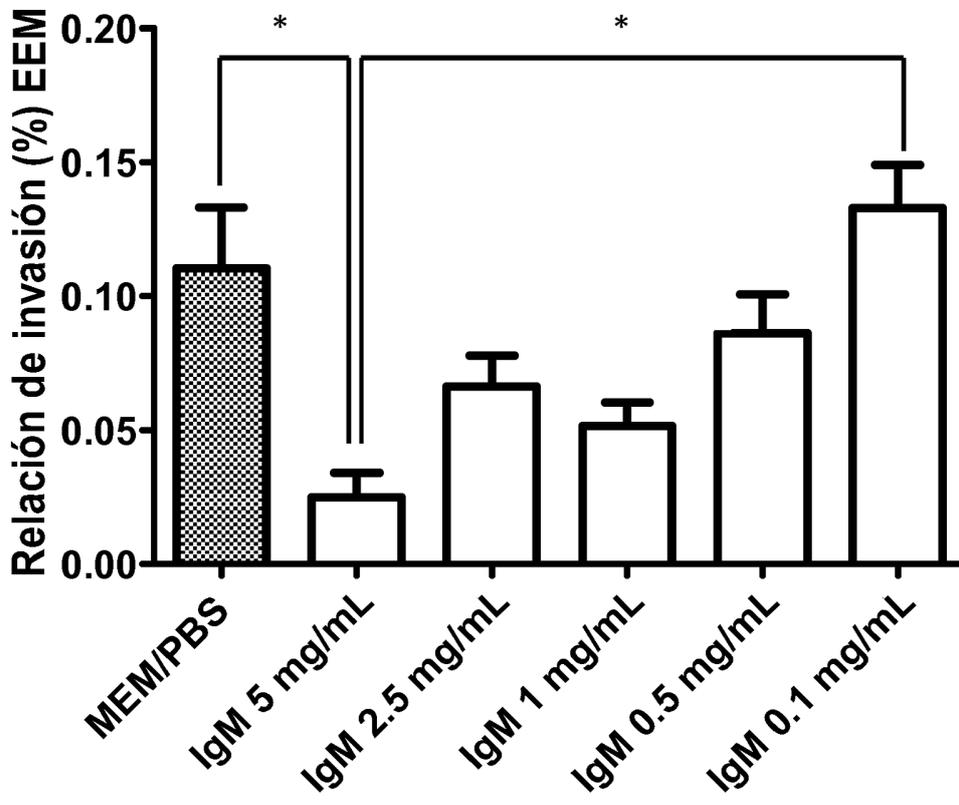


Figura 10

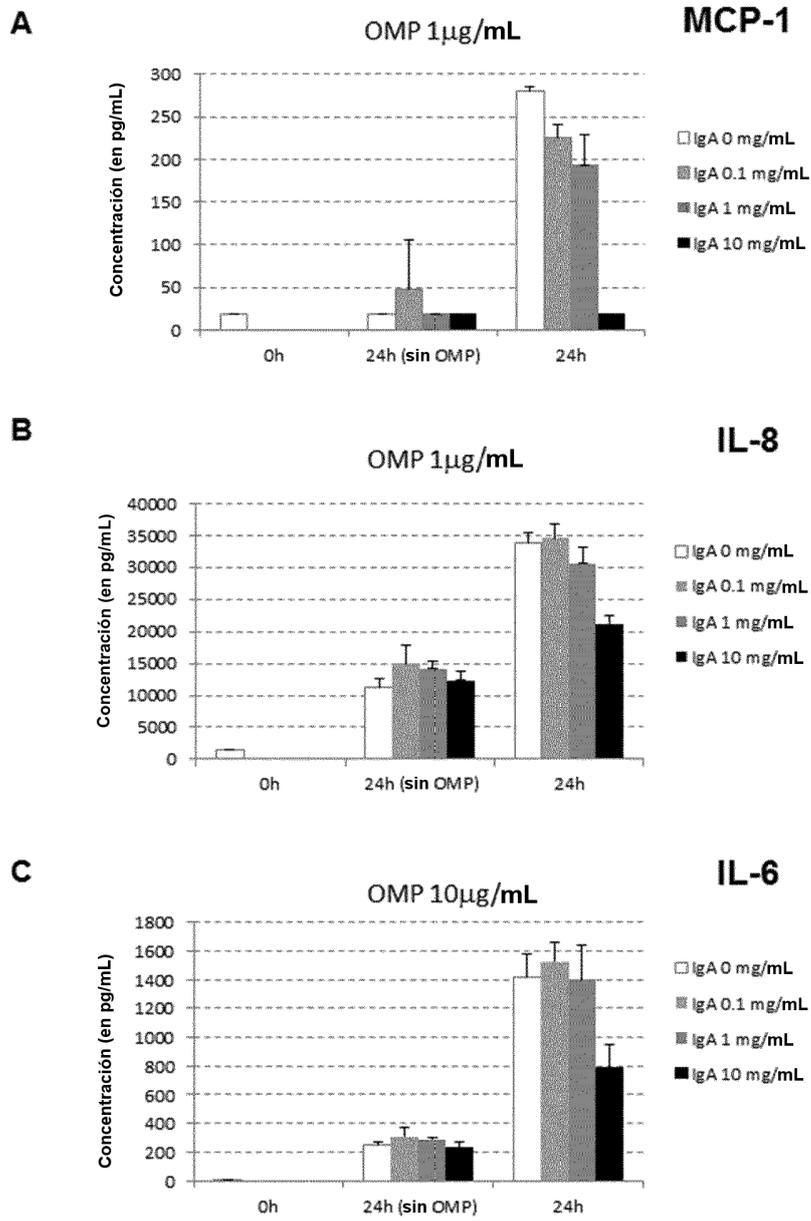
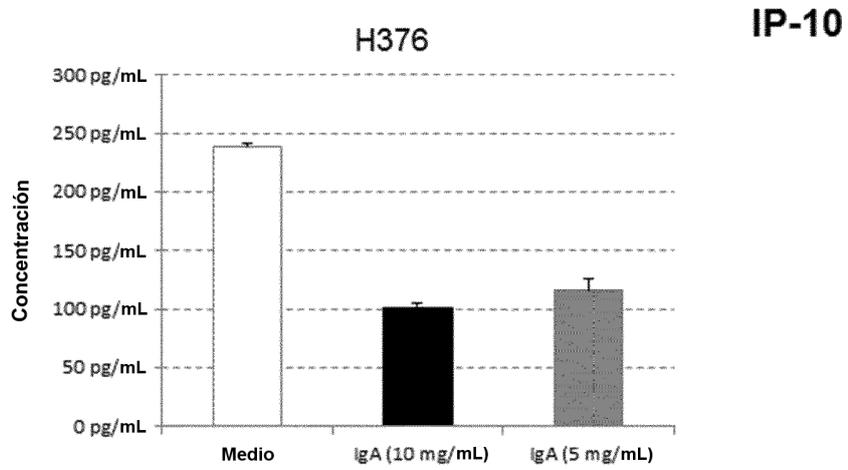


Figura 11

A



B

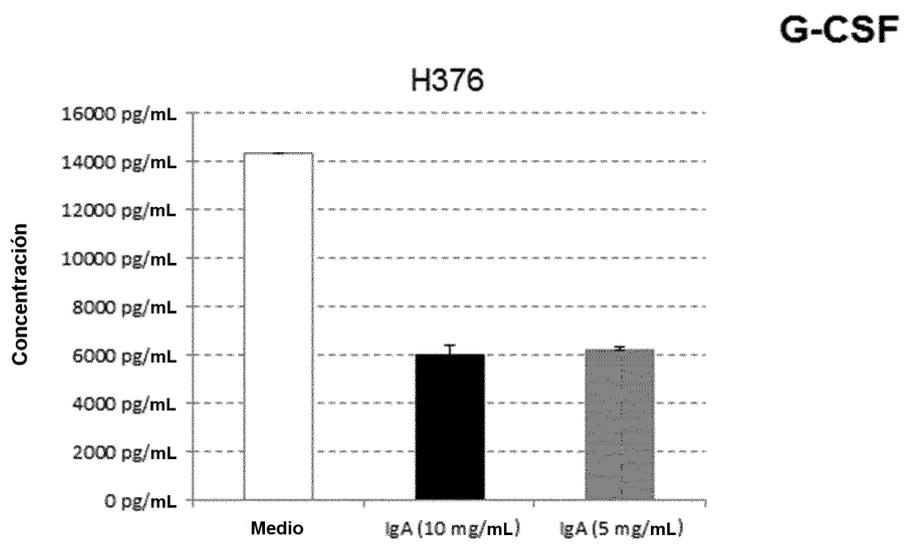


Figura 11, continuación

C

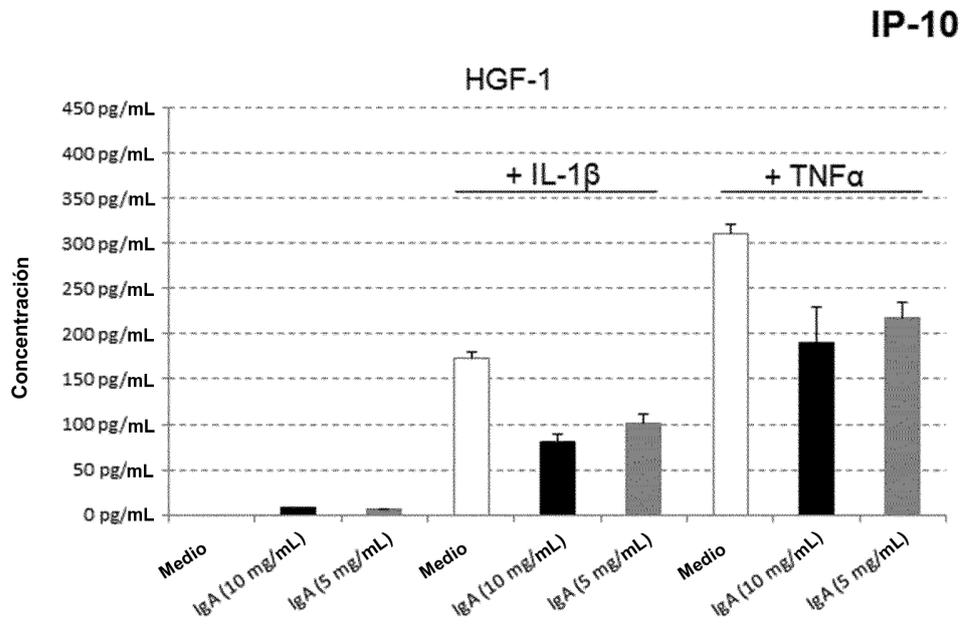
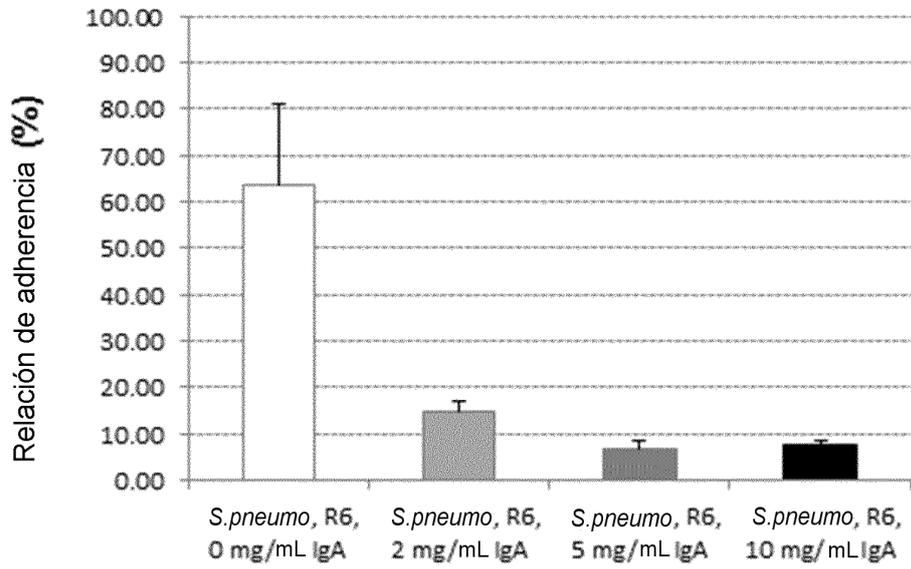


Figura 12

A



B

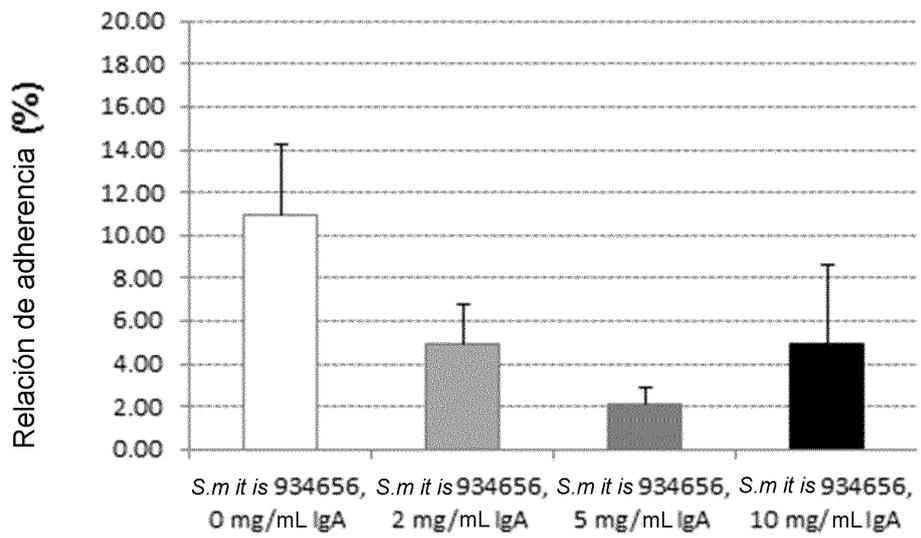
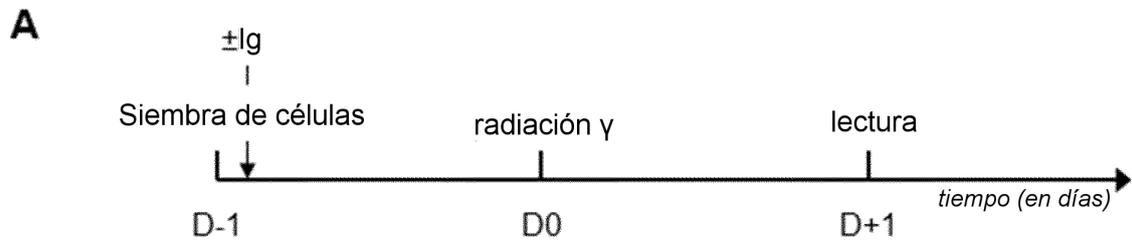


Figura 13



B

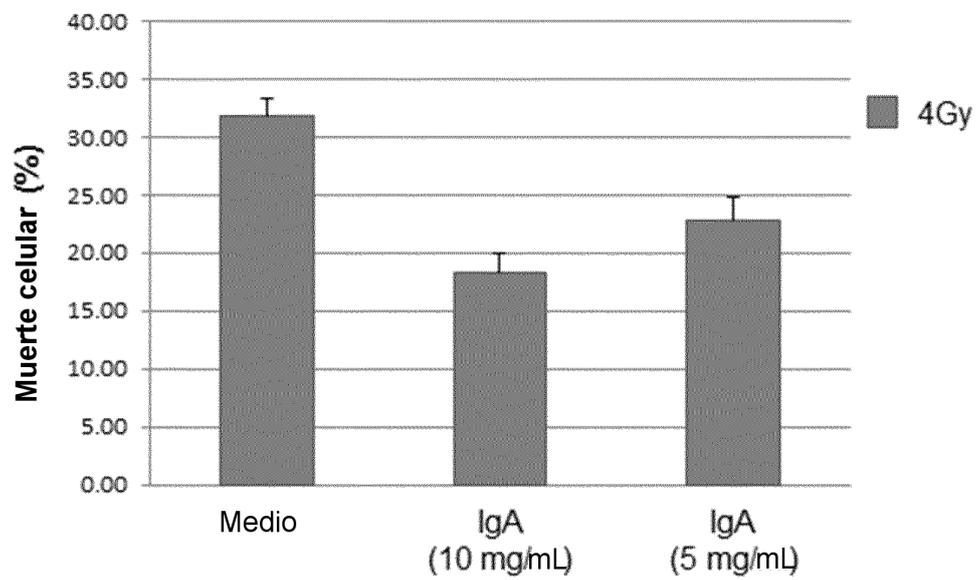


Figura 14

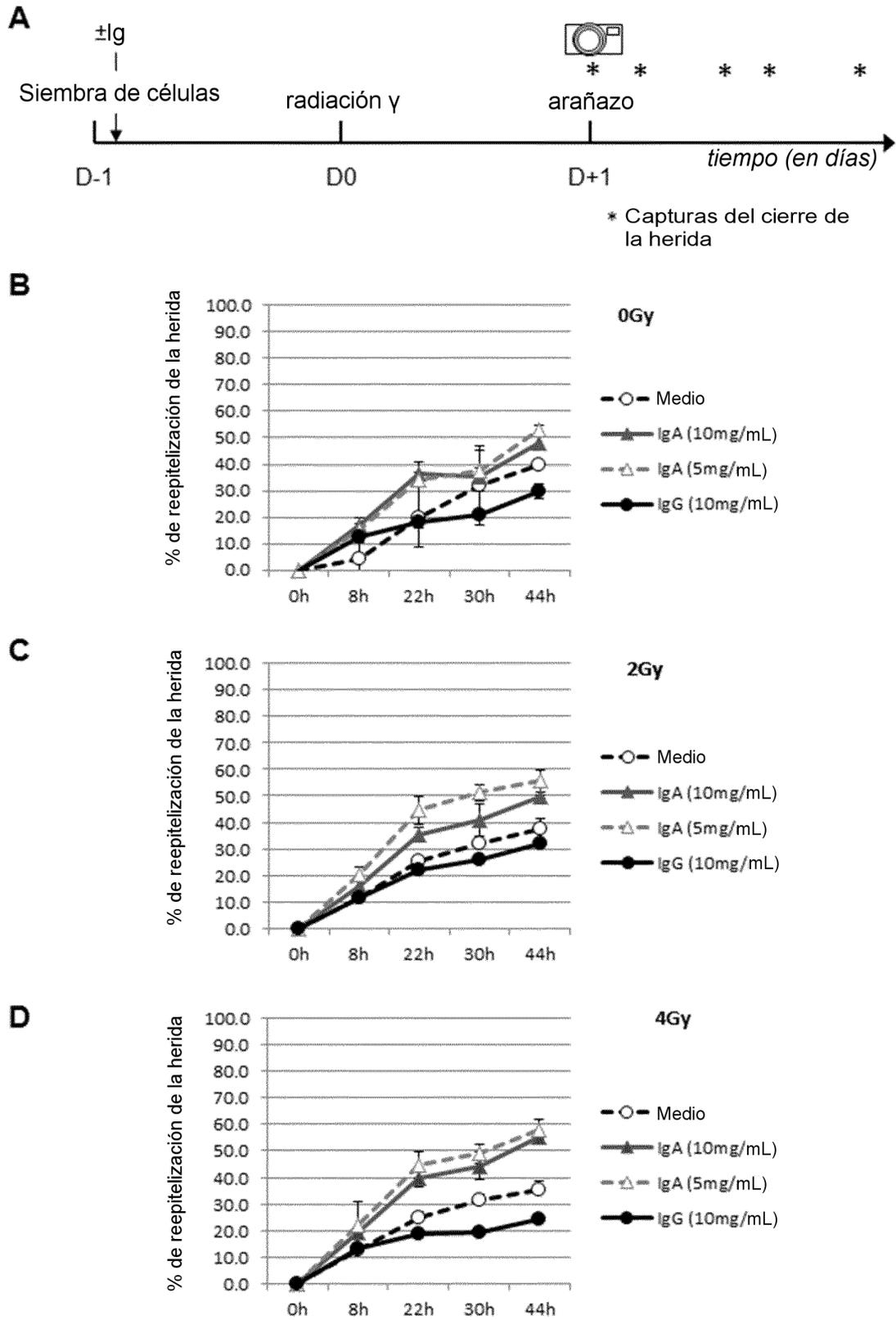


Figura 15

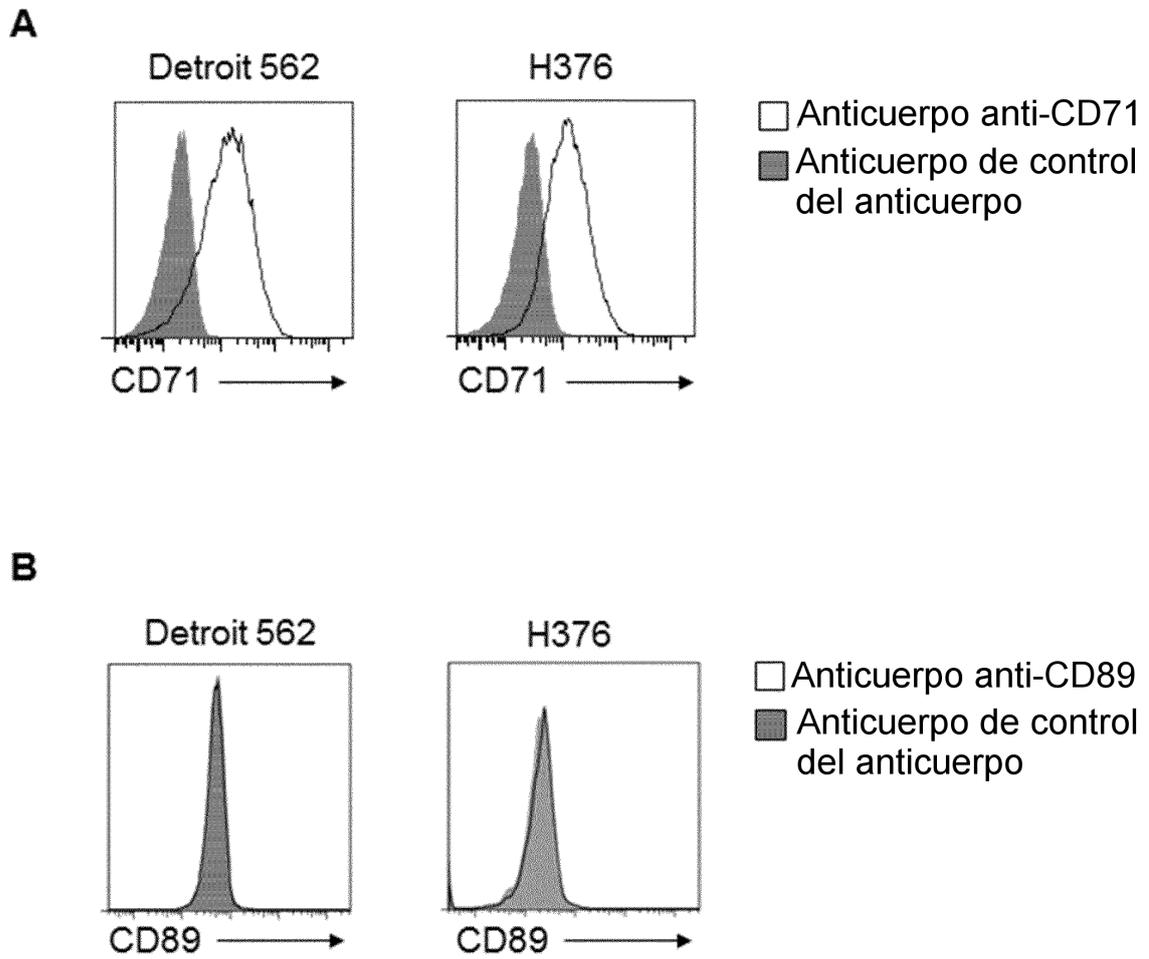


Figura 16

