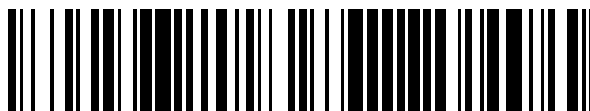


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 397**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2011** **PCT/EP2011/072711**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012** **WO12080306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011** **E 11794757 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018** **EP 2651440**

54 Título: **Activación de CD89 en terapia**

30 Prioridad:

14.12.2010 EP 10194942

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

04.05.2018

73 Titular/es:

CSL BEHRING AG (50.0%)

Wankdorfstrasse 10

3014 Bern, CH y

UNIVERSITÄT BERN (50.0%)

72 Inventor/es:

VON GUNTEN, STEPHAN;

WEHRLI, MARC;

ZÜRCHER, ADRIAN y

MIESCHER, SYLVIA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 666 397 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

Activación de CD89 en terapia

La invención se refiere al uso de moléculas activadoras de CD89, en particular moléculas que comprenden Fc alfa y, más en particular, IgA, para inducir la apoptosis en neutrófilos. Como alternativa, se pueden utilizar anticuerpos anti-CD89. La activación de CD89 es beneficiosa en el tratamiento de varios trastornos asociados con aumentos de los neutrófilos tales como trastornos autoinmunitarios, trastornos inflamatorios, NETosis o fibrosis quística.

Los neutrófilos componen una parte esencial del sistema inmunitario innato. Normalmente se encuentran en el torrente sanguíneo. Durante la fase aguda de una inflamación, p. ej., como resultado de una infección bacteriana, los neutrófilos migran hacia el lugar de la inflamación mediante quimiotaxis, atraídos por las citocinas/quimiocinas liberadas por el endotelio activado, los mastocitos y los macrófagos en el lugar de la infección o inflamación. Los neutrófilos también expresan y liberan citocinas, que amplifican las reacciones inflamatorias de otros tipos de células. Los neutrófilos desempeñan una función fundamental en la defensa frente a los patógenos invasores al utilizar la fagocitosis, la desgranulación, que libera así agentes antimicrobianos solubles, y la generación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET, por sus siglas en inglés), que comprenden una red de fibras compuesta por cromatina y proteínas granulares tales como serinproteasas que atrapan y destruyen microbios extracelularmente. Las NET también pueden atrapar a los patógenos y evitar que se extiendan adicionalmente. Los neutrófilos serán a menudo ellos mismos fagocitados por los macrófagos.

La inmunoglobulina A (IgA) es la clase de anticuerpo predominante en las superficies mucosas, donde representa la pieza clave de la inmunidad mucosa adaptativa. Las enfermedades asociadas con una falta total o parcial de IgA tales como la inmunodeficiencia variable común (CVID, por sus siglas en inglés) o la deficiencia de IgA completa se asocian con la infección gastrointestinal y sinopulmonar recurrente, bronquiectasia y enfermedades autoinmunitarias. Un hallazgo común en el estado agudo de estas afecciones inmunopatológicas es la infiltración neutrofílica, que mediante la liberación de mediadores tóxicos y enzimas catabólicas causa un daño tisular colateral sustancial. Por lo tanto, si bien los neutrófilos poseen muchas funciones beneficiosas, también pueden causar un daño significativo si no se eliminan eficazmente cuando el estímulo inicial se ha eliminado.

El receptor CD89 de IgA (FcAlfaR) es una glicoproteína transmembrana presente en la superficie de las células de linaje mieloide tales como neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos, donde media las respuestas inmunológicas a los patógenos. Interacciona con dianas opsonizadas de IgA y desencadena procesos de defensa inmunológica tales como fagocitosis, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, liberación de mediadores inflamatorios y desencadenamiento de actividad de estallido respiratorio.

Los inventores han descubierto recientemente de forma sorprendente que la activación de CD89, en particular mediante moléculas que comprenden Fc alfa tales como IgA o un anticuerpo anti-CD89, puede inducir apoptosis en neutrófilos y que esta actividad se ve potenciada cuando los neutrófilos han sido preactivados con, por ejemplo, componentes microbianos tales como ácido lipoteicoico (LTA) o lipopolisacárido (LPS) o citocinas tales como GM-CSF o TNF-alfa. Esta observación es muy relevante para el tratamiento de enfermedades que conllevan inflamación neutrofílica crónica, p. ej., afecciones inflamatorias autoinmunitarias, afecciones que conllevan una NETosis excesiva, infecciones crónicas con formación de pus o afecciones de inflamación mediada por neutrófilos estériles que puede persistir o hacerse crónica tras la resolución de una infección que inicialmente dio lugar al reclutamiento de neutrófilos al lugar de la infección. Por lo tanto, en la presente invención, la activación de CD89 realmente da lugar a una inhibición de la inflamación mediante la activación de la vía apoptótica en los neutrófilos.

Un aspecto de la invención es, por tanto, una molécula activadora de CD89 tal como una molécula que comprende Fc alfa para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria o trastorno autoinmunitario mediante la inducción de la apoptosis en neutrófilos, donde la molécula activadora de CD89 es una molécula que comprende Fc alfa, que se administra como una solución estéril. Preferentemente, la molécula que comprende Fc alfa es inmunoglobulina A (IgA). La IgA puede ser policlonal y puede proceder de suero o de plasma, preferentemente de suero o plasma humano. La IgA puede ser, por ejemplo, dimérica o monomérica o una mezcla de estas. La IgA dimérica también puede comprender una cadena J y puede comprender además un componente secretor. El uso de IgA monoclonal también se contempla. La IgA puede ser IgA1 o IgA2 o una mezcla de estas. Preferentemente, la IgA es humana, sin embargo, también se puede utilizar IgA de primate. La IgA dimérica procedente de suero o plasma también se puede combinar con un componente secretor, preferentemente un componente secretor recombinante, incluso más preferentemente con un componente secretor recombinante humano. También pueden presentarse ocasionalmente formas tetraméricas de IgA.

La molécula que comprende Fc alfa puede ser también Fc alfa en sí o una variante funcional de este (p. ej., una forma con la cola truncada, que carezca de algunos de los residuos aminoácidos C-terminales, por ejemplo, los 18 residuos aminoácidos C-terminales, remítase a Pleass, RJ *et al*, *J. Biol. Chem.* 274, 23508-23514, 1999), pero preferentemente es una proteína de fusión de la parte Fc de IgA o una variante funcional de esta con otra proteína, por ejemplo, con una albúmina tal como seroalbúmina humana. Sin embargo, se pueden utilizar también otras proteínas solubles como miembros para la fusión. Además, se contemplan partes de Fc alfa monocatenarias o

versiones monocatenarias de una variante funcional de Fc alfa, así como dímeros o incluso multímeros de tales partes de Fc alfa monocatenarias. Cuando se hace referencia a Fc alfa en el presente documento, también se pretende que estén englobadas por la expresión "Fc alfa" variantes funcionales de Fc alfa, p. ej., formas de cola truncada y/u otras variantes funcionales, p. ej., moléculas de Fc alfa con una o más sustituciones, deleciones o inserciones aminoacídicas que no den lugar a una pérdida de actividad activadora de CD89.

Una variante funcional es una molécula que retiene al menos un 30% de la actividad activadora de CD89 de la molécula original, preferentemente al menos un 40%, un 50% o un 60%, más preferentemente al menos un 70%, un 75%, un 80%, un 90%, un 95%, incluso más preferentemente al menos un 98%, de la forma más preferida la actividad completa. También se contempla que la variante funcional pudiese tener una actividad activadora de CD89 potenciada.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende la molécula activadora de CD89, preferentemente la molécula que comprende Fc alfa, donde al menos un 50% de la proteína de la composición es la molécula que comprende Fc alfa. Preferentemente, al menos un 60% de la proteína es la molécula que comprende Fc alfa, más preferentemente al menos un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90% o un 95%, de la forma más preferente al menos un 98%.

En otro aspecto de la invención, los neutrófilos que se tratan con la molécula activadora de CD89, preferentemente la molécula que comprende Fc alfa, se localizan en un paciente con un trastorno autoinmunitario o una afección inflamatoria, en particular, afecciones inflamatorias neutrofílicas crónicas. Algunos ejemplos del trastorno autoinmunitario o la afección inflamatoria son la inflamación neutrofílica estéril tal como un empiema pleural o un empiema en otras cavidades tales como el útero (piometra), inflamación infecciosa, p. ej., meningitis con pus, fibrosis quística, bronquiectasia, inflamación inducida por neutrófilos, NETosis, artritis, en particular artritis reumatoide, espondiloartritis, espondilitis anquilosante/Morbus Bechterew o artritis reactiva (p. ej., enfermedad de Reiter). Algunos ejemplos adicionales incluyen otras afecciones inflamatorias que están mediadas principalmente por neutrófilos tales como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD).

En otro aspecto de la invención, la molécula activadora de CD89, preferentemente la molécula que comprende Fc alfa, se administra localmente en el lugar con cifras de neutrófilos aumentadas, p. ej., en la articulación afectada de un paciente de artritis, en particular, en la articulación afectada de un paciente de artritis reumatoide o en el lugar de una inflamación infecciosa o estéril o en el lugar de una inflamación neutrofílica crónica.

Los neutrófilos pueden estar también situados en el pulmón de un paciente con fibrosis quística, donde la NETosis, es decir, formación excesiva de NET (trampa extracelular de neutrófilos), se ha correlacionado con una función pulmonar obstructiva alterada. En este caso, es conveniente administrar la molécula activadora de CD89, preferentemente la molécula que comprende Fc alfa, mediante inhalación. Preferentemente, se administra combinada con DNasa.

Además, la NETosis se puede asociar con la patogénesis de otras afecciones autoinflamatorias tales como preeclampsia, choque séptico y vasculitis autoinmunitaria. Otro aspecto de la invención es, por tanto, la molécula que comprende Fc alfa, en particular IgA, para su uso en el tratamiento de estas afecciones, preferentemente para su uso en la inducción de la apoptosis en neutrófilos, preferentemente en neutrófilos activados, localizados en pacientes que padecen estas afecciones.

La dosis eficaz de una molécula que comprende Fc alfa puede ser superior a la concentración de IgA en el plasma, preferentemente aproximadamente tres veces la concentración plasmática de IgA, más preferentemente aproximadamente 10 veces, 15 veces o 20 veces la concentración plasmática o incluso superior.

La molécula activadora de CD89, preferentemente la molécula que comprende Fc-alfa, está preferentemente comprendida en una composición farmacéutica, que comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición puede comprender además un estabilizante.

La vía de administración puede ser intravenosa, subcutánea, inhalada, intranasal, tópica (es decir, superficie cutánea o mucosa que incluye el intestino o el ojo, administrada como gotas oftálmicas), oral, pero preferentemente la administración tiene lugar localmente, es decir, en el lugar de la infiltración o actividad de neutrófilos excesiva, p. ej., en la articulación artrítica, mediante inhalación para la fibrosis quística, mediante inyección en el lugar de una infección estéril, etc. La forma farmacéutica puede ser un comprimido, una cápsula, una crema, un supositorio, pero preferentemente es una solución estéril. El producto se puede proporcionar en forma liofilizada y reconstituirse en forma líquida antes de su uso o se puede proporcionar como una formulación líquida estable.

Otro aspecto de la invención es la molécula activadora de CD89 tal como la molécula que comprende Fc-alfa que se utiliza combinada con otros agentes terapéuticos tales como compuestos antiinflamatorios, p. ej., AINE, anticuerpos que pueden modular la respuesta inmunitaria como anti-CD20 (p. ej., Rituxan), anti-TNFalfa (p. ej., Remicade, Humira), antibióticos, compuestos antivirales tales como ganciclovir, compuestos antifúngicos tales como Voriconazol o compuestos antiprototozoicos.

La molécula que comprende Fc alfa puede ser IgA policlonal, p. ej., aislada a partir de suero o plasma, preferentemente a partir de suero o plasma humano. Más preferentemente, se purifica a partir de una mezcla de plasma humano. Incluso más preferentemente, se purifica como un subproducto de fraccionamiento del plasma humano y/o posterior purificación de proteínas plasmáticas, de la forma más preferida a partir de una fracción secundaria que se produce durante la fabricación de preparados de IgG (p. ej., IVIg o SCIG) a partir de plasma humano combinado y/o a partir de un precipitado obtenido durante la fabricación de preparados de IgG a partir de plasma.

Preferentemente, los dímeros de IgA se aíslan (o enriquecen) a partir de plasma humano mezclado. Más preferentemente, estos dímeros se combinan además con un componente secretor, p. ej., un componente secretor producido de forma recombinante. Es probable que la IgA secretora resultante sea más estable en ambientes con niveles elevados de proteasas, p. ej., el fluido sinovial de una articulación artrítica o el pulmón o intestino inflamados. Como la mayoría de proteínas granulares neutrófilas son proteasas, esta puede ser una forma particularmente preferida de llevar a cabo la presente invención.

Como alternativa, la IgA puede ser monoclonal. La IgA monoclonal puede ser producida por las líneas celulares del hibridoma o por líneas celulares diseñadas, que comprenden el ADNc para la cadena ligera y la cadena pesada en un plásmido de expresión con un promotor apropiado y opcionalmente elementos reguladores adicionales. El experto conoce bien métodos para producir hibridomas, p. ej., mediante fusión o inmortalización celular de linfocitos B que produzcan IgA. Los métodos para aislar los ADNc que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo y clonar estos ADNc en vectores de expresión apropiados también son muy conocidos en la técnica. A continuación, los vectores de expresión se pueden transfectar en líneas celulares, por ejemplo, líneas celulares de mamíferos tales como células CHO o células HEK293 y se pueden seleccionar líneas celulares que expresen de forma estable el anticuerpo deseado. Algunas técnicas adecuadas se encuentran, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular biology*, Ausubel FM *et al.* (eds.) John Wiley & Sons, Inc.; <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>. También se pretende que las variantes funcionales de IgA, p. ej., IgA con una o más sustituciones, deleciones o inserciones aminoácidas que no den lugar a una pérdida de actividad activadora de CD89, estén englobadas cuando se utilice el término "IgA" a lo largo del presente documento.

La molécula que comprende Fc alfa puede ser también una proteína de fusión diseñada. Por ejemplo, el ADNc que codifica la parte Fc alfa de la cadena pesada de IgA está fusionada en fase con el marco de lectura con el ADNc que codifica otra proteína, preferentemente una proteína soluble, por ejemplo, seroalbúmina humana. Algunos ejemplos de secuencias de ADNc de Fc alfa adecuados se muestran en las SEQ ID NO: 1 y 2.

La molécula que comprende Fc alfa puede ser también una proteína Fc alfa monocatenaria, en la que dos ADNc de Fc alfa se encuentren unidos por un ácido nucleico que codifique un péptido conector, similar a la forma en que están diseñados los fragmentos de Fv monocatenarios. (Worn A, Plückthun A. *J. Mol. Biol.*, 2001; 305: 989-1010). Dos o más de dichas proteínas Fc alfa monocatenarias también se pueden conectar para formar un dímero o un multímero de unidades de Fc alfa. Dichas moléculas se pueden producir mediante técnicas rutinarias, por ejemplo, tal como se describe en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM *et al.* (eds.) John Wiley & Sons, Inc.; <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>. Por ejemplo, la parte Fc alfa de la cadena pesada de IgA se puede amplificar a partir de una célula que produzca IgA mediante RT-PCR, utilizando cebadores diseñados para que contengan sitios de restricción apropiados. Los ADNc resultantes se pueden digerir a continuación con la o las enzimas de restricción correspondientes y clonar en un vector de expresión preparado de forma adecuada. Los oligonucleótidos sintéticos que codifican péptidos conectores se pueden insertar en las posiciones apropiadas, por ejemplo, digiriendo el ADNc con enzimas de restricción apropiadas y ligando los oligonucleótidos con los finales diseñados de forma adecuada en el vector. El plásmido de expresión completa se puede producir a continuación en grandes cantidades, p. ej., en *E. coli*, utilizando técnicas estándar. Después de la purificación, este se puede transfectar en células de mamíferos y se pueden producir líneas celulares que expresen de forma estable las proteínas deseadas. A continuación, se pueden purificar las proteínas. Existen técnicas estándar disponibles para llevar a cabo estos procedimientos.

Las partes Fc alfa quiméricas, que comprenden, por ejemplo, un dominio constante de la cadena pesada de IgA1 y un dominio constante de la cadena pesada de IgA2 también se contemplan; el experto conoce bien los dominios de inmunoglobulina y puede identificar las fronteras de los dominios y combinar los dominios de inmunoglobulina como desee. También se incluyen combinaciones de partes de Fc alfa con una cadena J; adicionalmente, la molécula resultante se puede combinar también con un componente secretor. Tal como se ha mencionado anteriormente, se pueden utilizar fragmentos funcionales de Fc alfa y variantes funcionales; también se incluyen proteínas de fusión, dímeros, multímeros, combinaciones de dichas variantes funcionales con una cadena J o con una cadena J y un componente secretor.

El componente secretor preferido contiene al menos un segmento de los residuos aminoácidos 1 a aproximadamente el residuo 606 de la secuencia de aminoácidos del receptor de inmunoglobulina polimérico humano (pIgR) o variantes de este, p. ej., partes análogas de una especie de mamífero diferente. Sin embargo, se

prefiere la secuencia humana. La secuencia proteica del plgR humano se puede encontrar con el número de acceso en SwissProt P01833 (remítase también a Krajci *et al.*, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 158, 783-789).

También se divulga que la proteína activadora de CD89 puede ser anti-CD89. El experto conocerá bien métodos para producir anti-CD89. El CD89 o fragmentos de este se pueden utilizar como antígeno para producir un antisuero específico. Los anticuerpos se pueden aislar a partir de un antisuero de este tipo. También se pueden producir anticuerpos monoclonales y los métodos para producir tales anticuerpos monoclonales son muy conocidos para el experto. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD89 monoclonal es un anticuerpo humano, p. ej., producido a partir de linfocitos B humanos inmortalizados o en un animal donde los propios genes de inmunoglobulina del animal hayan sido reemplazados al menos parcialmente por los genes humanos correspondientes. Las técnicas utilizadas para la producción de anticuerpos son muy conocidas y se describen en detalle en varios manuales de laboratorio, p. ej., Ed Harlow & David Lane: *Antibodies, A Laboratory Manual* o Sambrook *et al.*: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (ambos de CSHL).

La invención se ilustra en los siguientes ejemplos. Los ejemplos se conciben como una ilustración de una forma para llevar a cabo la invención y no deberían limitar la invención.

Ejemplos: Inducción de la apoptosis en neutrófilos

Materiales y métodos

Anticuerpos: El anti-CD89 (Clon A59) (ambos no marcados y conjugados con ficoeritrina [PE]) y el control de isotipo de inmunoglobulina G1 (IgG1) conjugado con PE eran de BD Biosciences (Basilea, Suiza). La IgG de cabra antiratón (GaM) y la IgG1 de control no marcada se obtuvieron de Jackson ImmunoResearch Laboratories (distribuido por Milan Analytica, La Roche, Suiza). El mAb agonístico anti-Fas (CH11) se obtuvo de LabForce AG (Nunningen, Suiza). La IgA de suero mezclado se obtuvo de CSL Behring AG (Wankdorf, Berna) y se preparó de la siguiente forma: la IgA se purificó a partir de plasma humano y una fracción secundaria del proceso de fabricación de IVIg/SCIg mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de IgA humana CaptureSelect de BAC (Naarden, Holanda). De forma resumida, la fracción secundaria o el plasma mezclado humano crioprecipitado se cargó en una columna de IgA humana CaptureSelect equilibrada en condiciones próximas a las fisiológicas (pH, conductividad), sin exceder la capacidad de unión a IgA de la columna. Después de la carga, la columna se lavó con solución salina tamponada con fosfato y se eluyó la IgA con un tampón de glicina a pH 3. Se corrigió el pH de los eluatos y se concentraron hasta 50 mg/mL de proteína. La IgA monomérica se puede purificar a partir de IgA plasmática obtenida tal como se ha descrito anteriormente mediante cromatografía de exclusión de tamaños preparativa, por ejemplo, utilizando una resina en gel Superdex 200. Células: Los neutrófilos sanguíneos se aislaron a partir de individuos sanos, así como de pacientes que padecían artritis reumatoide (AR) asociada con una inflamación de las articulaciones aguda. De forma resumida, las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC, por sus siglas en inglés) se separaron por centrifugación en Ficoll-Hypaque (Seromed-Fakola AG, Basilea, Suiza). La fase inferior, principalmente granulocitos y eritrocitos, se trató con solución de lisis de eritrocitos (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM y EDTA [ácido etilendiaminotetraacético] 0.1 mM, pH 7.3). Las poblaciones celulares resultantes contenían principalmente neutrófilos. Los neutrófilos de los fluidos de articulaciones procedentes de pacientes con AR se aislaron utilizando el mismo protocolo. La pureza celular se evaluó mediante tinción con Diff-Quik (Baxter, Düringen, Suiza) y análisis de microscopía óptica. La pureza de las poblaciones resultantes fue de al menos un 95% para los neutrófilos.

Inmunofluorescencia: Se analizó la expresión superficial de CD89 mediante citometría de flujo tras la incubación de las células con concentraciones saturantes de anti-CD89 conjugado con PE y mAbs de control conjugados con PE de isotipos compatibles.

Cultivos celulares: Los neutrófilos se cultivaron con una concentración de $1 \times 10^6/\text{mL}$ en presencia o ausencia de citocinas o LPS y/o anticuerpos durante los tiempos indicados utilizando medio de cultivo completo (RPMI 1640 que contenía un 10% de suero bovino fetal [FCS] y 200 UI/mL de penicilina/100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin, todos de Life Technologies, Basilea, Suiza). Si no se indica de otro modo, las células se estimularon con 17.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mAb anti-CD89 o con 10 mg/mL de IgA plasmática. Se utilizó GM-CSF (Novartis Pharma GmbH, Nuremberg, Alemania) con una concentración de 25 ng/mL, mAb anti-Fas (CH11) con una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se utilizó LPS (Sigma Aldrich, Buchs, Suiza) con una concentración de 100 ng/mL. Se utilizó anticuerpo de cabra antiratón con una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, G-CSF (Aventis Pharma, Zurich, Suiza) con una concentración de 25 ng/mL, IFN- γ (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Alemania) con una concentración de 85 ng/mL IFN- α (PBL Biomedical Laboratories, distribuido por Alexis) con una concentración de 500 U/mL, TNF- α (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Alemania) con una concentración de 25 ng/mL, y LTA (Obsequio de T. Hartung University de Konstanz) con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El inhibidor de caspasa qVD-OPH (quinolino-Val-Asp-difluorofenoximetilcetona) se utilizó con una concentración 20 μM .

Determinación de muerte celular y apoptosis: La muerte celular se evaluó mediante la captación de bromuro de etidio 1 μM y análisis de citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson). Con el fin de determinar la forma de la muerte celular, se llevaron a cabo análisis morfológicos y análisis de anexina V. Para los análisis morfológicos, las

células se cultivaron durante 15 horas y se tiñeron con Giemsa-May-Grünwald (Diff-Quik). Se utilizó un microscopio Axiovert 35 equipado con una lente objetivo de aceite 630/1.4 (Carl Zeiss, Heidelberg, Alemania). Las imágenes se procesaron con el software Adobe Photoshop 5.0 (Adobe, San Jose, CA). Con el fin de determinar si la muerte celular era apoptosis, se midió la redistribución de fosfatidilserina (PS) en la membrana del neutrófilo mediante tinción con anexina V y citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson) utilizando un kit de detección de apoptosis que se puede adquirir de distribuidores comerciales de acuerdo con el protocolo del fabricante (BD Biosciences), en presencia de yoduro de propidio (PI) (von Gunten S *et al.*, *Blood* 2005; 106: 1423-1431.). Con el fin de detectar la fragmentación de ADN, un distintivo típico de la apoptosis, las células se permeabilizaron con una solución de fluorocromo hipotónica (50 µg/mL de yoduro de propidio, 0.1% de citrato sódico, 0.1% de Triton X-100), lo que dio lugar a un escape de multímeros de ADN (182 pb) fuera de la célula. La cantidad de ADN reducida restante se tiñó a continuación con el agente intercalante de ADN yoduro de propidio y se analizó mediante citometría de flujo (Nicoletti I *et al.*, *J Immunol. Methods* 1991; 139: 271-279).

Análisis estadístico: Se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando la prueba t de Student. Cuando se presentan niveles medios, el error estándar de la media (SEM) y el número (n) de experimentos independientes se indican en cada caso. Un valor de probabilidad inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

Ejemplo 1: expresión de CD89 en neutrófilos tras la estimulación con LPS o GM-CSF

Los neutrófilos se aislaron a partir de la sangre de voluntarios sanos tal como se ha descrito anteriormente. Las células se incubaron en presencia o ausencia de un estímulo inflamatorio (100 ng/mL de LPS o 10 ng/mL de GM-CSF) durante 8 horas. Las células se incubaron a continuación con anti-CD89 marcado con ficoeritrina (PE) o anticuerpo de control de isotipo compatible marcado con PE. A continuación, se evaluó la expresión de CD89 mediante citometría de flujo.

Los neutrófilos expresaron CD89 en ausencia de estímulo inflamatorio (Fig. 1A) y la expresión de CD89 aumentó cuando las células se incubaron en presencia de un estímulo inflamatorio tal como LPS (Fig 1A, panel izquierdo) o GM-CSF (Fig 1A, panel derecho). Los perfiles de las células teñidas con el anticuerpo de control también se muestran. La Fig. 1B muestra la evolución temporal del aumento de CD89 con LPS y GM-CSF. Se observó un aumento significativo de la expresión después de 4 horas.

Ejemplo 2: La unión de CD89 estimula la muerte celular de los neutrófilos

Los neutrófilos se aislaron tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, las células se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-CD89, anticuerpo anti-Fas, anti-Fas + anti-CD89, cada uno en presencia y ausencia de anticuerpo de cabra antiratón (GaM). Se evaluó la muerte celular mediante captación de bromuro de etidio y análisis de citometría de flujo. La unión de CD89 por parte de un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD89 dio como resultado una muerte celular de neutrófilos significativamente mayor (Fig. 2A), similar a la muerte celular inducida por anti-Fas. La muerte mediada por CD89 se potenció adicionalmente de forma significativa mediante entrecruzamiento. Se muestran los resultados de cultivos de 22 horas (n = 5). (B) Una curva del efecto de la concentración de mAb anti-CD89 en cultivos de neutrófilos de 22 horas indicó unos efectos de muerte máximos con 17.5 µg/mL (n = 5) (Fig. 2B).

La IgA aislada a partir de plasma o IgA monoclonal y otras moléculas que comprendan Fc alfa mostrarán efectos similares, en particular, si se logra un entrecruzamiento de CD89.

Ejemplo 3: el CD89 y la IgA de suero inducen la muerte celular de los neutrófilos

Los neutrófilos sanguíneos se aislaron a partir de voluntarios sanos tal como se ha descrito anteriormente. Las células se incubaron con medio en presencia o ausencia de IgA plasmática con una concentración de 10 mg/mL (Fig. 3A) o mAb anti-CD89 con una concentración de 17.5 µg/mL (Fig. 3B) en presencia de varios estímulos inflamatorios. La IgA aumentó claramente la muerte celular en neutrófilos activados (Fig. 3A). Se obtuvieron resultados similares con el anticuerpo monoclonal anti-CD89, que se muestran en la Figura 3B. La IgA plasmática total (que contenía monómeros y dímeros) y una subfracción monomérica de IgA plasmática fueron igualmente eficaces para inducir la muerte celular de los neutrófilos (Fig. 3C).

Ejemplo 4: Los neutrófilos de pacientes de espondiloartritis anquilosante expresan niveles aumentados de CD89

Los neutrófilos se aislaron a partir de sangre de un voluntario sano y de un paciente de espondiloartritis anquilosante. A continuación, se incubaron con mAb anti-CD89 marcado con PE o con un anticuerpo de control marcado con PE y se analizó la expresión de CD89 mediante citometría de flujo. Los neutrófilos del paciente de espondiloartritis anquilosante mostraron una expresión superficial de CD89 significativamente mayor (Fig. 4, línea sólida) en comparación con el donante sano (Fig. 4, línea de puntos). La tinción con mAb de control de isotipo compatible de las mismas muestras de neutrófilos también se presenta.

Ejemplo 5: Los neutrófilos aislados a partir de pacientes son más sensibles a la muerte celular mediada por IgA y anti-CD89

Los neutrófilos se aislaron a partir de sangre de voluntarios sanos con fines de control y del fluido de articulaciones/sinovial de pacientes de artritis (pacientes que padecen artritis reumatoide, espondilartrosis anquilosante, artritis psoriásica y artritis "desconocida") y se cultivaron durante 24 horas en presencia o ausencia de anticuerpo anti-CD89 o medio, posteriormente la muerte celular de los neutrófilos se analizó tal como se ha descrito anteriormente. El anti-CD89 dio lugar a una tasa elevada de muerte en los neutrófilos sinoviales de los pacientes de artritis. La tasa de muerte fue significativamente superior que la de los neutrófilos de la sangre de voluntarios sanos tal como se muestra en la Figura 5A. El mismo efecto se observó con la IgA plasmática con una concentración de 10 mg/mL (Fig. 5B).

Ejemplo 6: El inhibidor de pan-caspasa qVD-OPh inhibe la muerte celular mediada por IgA en los neutrófilos

Los neutrófilos se aislaron a partir de sangre de voluntarios sanos tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, las células se cultivaron durante 24 horas en presencia o ausencia de un estímulo inflamatorio (LPS, GM-CSF) y se evaluó la muerte celular en ausencia o presencia de IgA y/o inhibidor de pan-caspasa qVD-OPh (20 µM). Los resultados se muestran en la Figura 6. El inhibidor de pan-caspasa qVD-OPh bloqueó la muerte celular de los neutrófilos mediada por IgA plasmática tanto en presencia como en ausencia de LPS y GM-CSF. A modo de control se muestra la inducción de la apoptosis con un mAb anti-Fas y su inhibición con qVD-OPh. Estos hallazgos indican que la muerte celular de los neutrófilos mediada por IgA es una muerte celular programada dependiente de caspasa, es decir, apoptosis.

Ejemplo 7: Redistribución de fosfatidilserina tras la unión de IgA de suero mezclado a los neutrófilos, tal como se muestra mediante la tinción con Anexina V

Los neutrófilos se aislaron a partir de sangre de voluntarios sanos tal como se ha descrito anteriormente y se incubaron en medio, medio con GM-CSF o LPS, en presencia o ausencia de IgA plasmática o mAb anti-CD89. Para el control, se incubaron neutrófilos con un mAb anti-Fas inductor de apoptosis. Después de 6 horas, se evaluó la distribución de fosfatidilserina mediante tinción con Anexina V y citometría de flujo. Después de 10 horas, se evaluó la fragmentación de ADN mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. La unión de IgA de suero mezclado en presencia de GM-CSF o LPS dio como resultado una gran redistribución de fosfatidilserina (Fig. 7A) y fragmentación de ADN (Fig. 7B), ambas indicativas de la inducción de la apoptosis de neutrófilos. Se obtuvieron resultados comparables al utilizar un mAb anti-CD89 en lugar de IgA plasmática (Fig 7A, 7B). Estos gráficos de dispersión muestran un experimento representativo de 5. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. En la figura 7B, el número relativo de células apoptóticas (porcentaje) se indica en cada histograma.

Ejemplo 8: Morfología de la muerte de los neutrófilos mediada por CD89

Los neutrófilos se aislaron a partir de sangre de voluntarios sanos tal como se ha descrito anteriormente. Estos se cultivaron durante 15 horas en presencia de medio solo, GM-CSF o LPS, en presencia y ausencia de anti-CD89. Se tiñeron con Giemsa-May-Grünwald (Diff-Quik) y se examinaron mediante microscopía. La muerte de neutrófilos mediada por CD89 mostró las características morfológicas típicas de la apoptosis clásica (volumen celular reducido, núcleos fragmentados). Se espera que la muerte de neutrófilos mediada por IgA muestre la misma morfología.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CSL Behring AG

<120> Activación de CD89 en terapia

<130> A175

<150>EP2010194942

<151> 14-12-2010

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210>1

<211>687

ES 2 666 397 T3

<212>ADN

< 213> Homo sapiens

<400>1

	ccccgactgt cactgcaccg accggccctc gaggacctgc tcttaggttc agaagcgaac	60
	ctcacgtgca cactgaccgg cctgagagat gcctcaggtg tcaccttcac ctggacgccc	120
	tcaagtggga agagcgctgt tcaaggacca cctgaccgtg acctctgtgg ctgctacagc	180
	gtgtccagtg tctgtcggg ctgtgccgag ccatggaacc atgggaagac cttcacttgc	240
	actgtctgct accccgagtc caagaccccg ctaaccgcca ccctctcaaa atccggaaac	300
	acattccggc ccgaggtcca cctgctgccg ccgccgtcgg aggagctggc cctgaacgag	360
	ctggtgacgc tgacgtgcct ggcacgtggc ttcagcccca aggatgtgct ggttcgctgg	420
	ctgcaggggt cacaggagct gcccgcgag aagtacctga cttgggcatc ccggcaggag	480
	cccagccagg gcaccaccac cttcgtctgtg accagcatac tgcgcgtggc agccgaggac	540
	tggaagaagg gggacacctt ctctgcatg gtgggccacg aggccctgcc gctggccttc	600
	acacagaaga ccatcgaccg cttggcgggt aaaccaccc atgtcaatgt gtctgttgtc	660
5	atggcggagg tggacggcac ctgctac	687

<210>2

<211>687

<212>ADN

< 213> Homo sapiens

10

<400> 2

	ccccgactgt cgctgcaccg accggccctc gaggacctgc tcttaggttc agaagcgaac	60
	ctcacgtgca cactgaccgg cctgagagat gcctctggtg ccaccttcac ctggacgccc	120
	tcaagtggga agagcgctgt tcaaggacca cctgagcgtg acctctgtgg ctgctacagc	180
	gtgtccagtg tctgtcctgg ctgtgccgag ccatggaacc atggggagac cttcacctgc	240
	actgtctgcc accccgagtt gaagacccca ctaaccgcca acatcacaaa atccggaaac	300
	acattccggc ccgaggtcca cctgctgccg ccgccgtcgg aggagctggc cctgaacgag	360
	ctggtgacgc tgacgtgcct ggcacgtggc ttcagcccca aggatgtgct ggttcgctgg	420
	ctgcaggggt cacaggagct gcccgcgag aagtacctga cttgggcatc ccggcaggag	480
	cccagccagg gcaccaccac cttcgtctgtg accagcatac tgcgcgtggc agccgaggac	540
	tggaagaagg gggacacctt ctctgcatg gtgggccacg aggccctgcc gctggccttc	600
	acacagaaga ccatcgaccg cttggcgggt aaaccaccc atgtcaatgt gtctgttgtc	660
	atggcggagg tggacggcac ctgctac	687

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula activadora de CD89 para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria o un trastorno autoinmunitario, mediante la inducción de la apoptosis en neutrófilos, donde la molécula activadora de CD89 es una molécula que comprende Fc alfa, que se administra como una solución estéril.
2. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde esta es inmunoglobulina A (IgA).
3. La IgA para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde la IgA procede de suero o plasma.
4. La IgA para el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, donde la IgA es dimérica.
5. La IgA para el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, donde la IgA es monomérica.
- 10 6. La IgA para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el dímero de IgA comprende una cadena J.
7. La IgA para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el dímero de IgA comprende un componente secretor.
8. La IgA para el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, donde la IgA comprende IgA monomérica y dimérica.
- 15 9. La IgA para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que es policlonal.
10. La IgA para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4 a 8, que es monoclonal.
11. La IgA para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, donde la IgA es IgA1 o IgA2 o una mezcla de estas.
- 20 12. La molécula activadora de CD89 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el trastorno autoinmunitario o la afección inflamatoria se selecciona a partir de inflamación neutrofílica estéril, inflamación infecciosa, inflamación inducida por neutrófilos, enfermedad inflamatoria del intestino y NETosis.
- 25 13. La molécula activadora de CD89 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el trastorno autoinmunitario es artritis, en particular, artritis reumatoide, espondiloartritis, espondilitis anquilosante/Morbus Bechterew o artritis reactiva.
14. La molécula activadora de CD89 para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la molécula activadora de CD89 se administra localmente.
15. La molécula activadora de CD89 para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde la NETosis se asocia con la fibrosis quística.
- 30 16. Una composición farmacéutica que comprende una molécula activadora de CD89, donde la molécula activadora de CD89 es una molécula que comprende Fc alfa y donde al menos un 50% de la proteína en la composición es la molécula activadora de CD89, para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria o un trastorno autoinmunitario mediante la inducción de la apoptosis en neutrófilos.

Figura 1

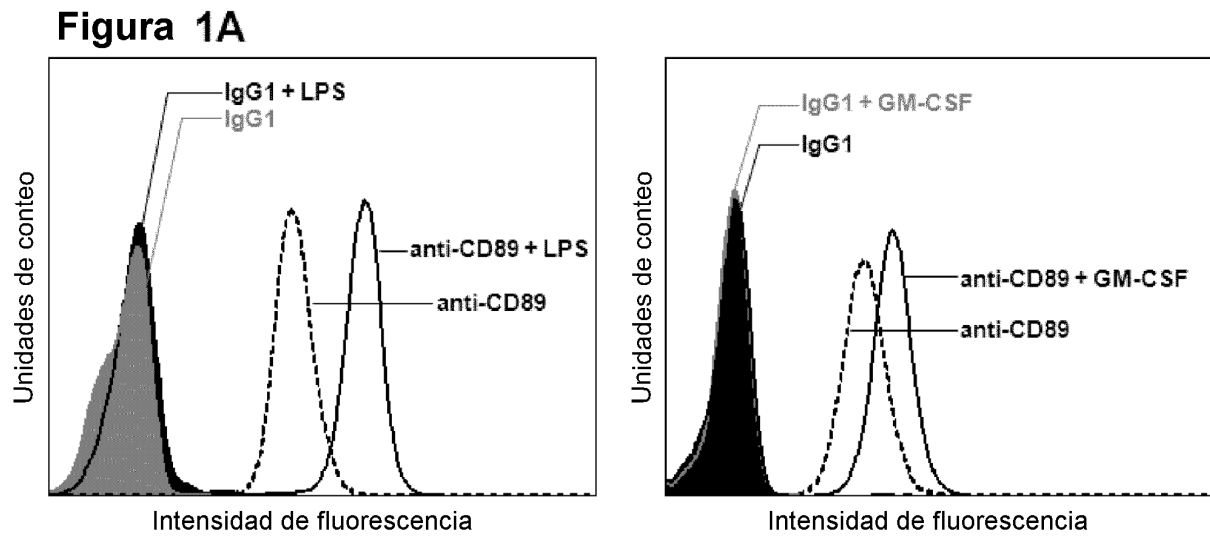


Figura 1B

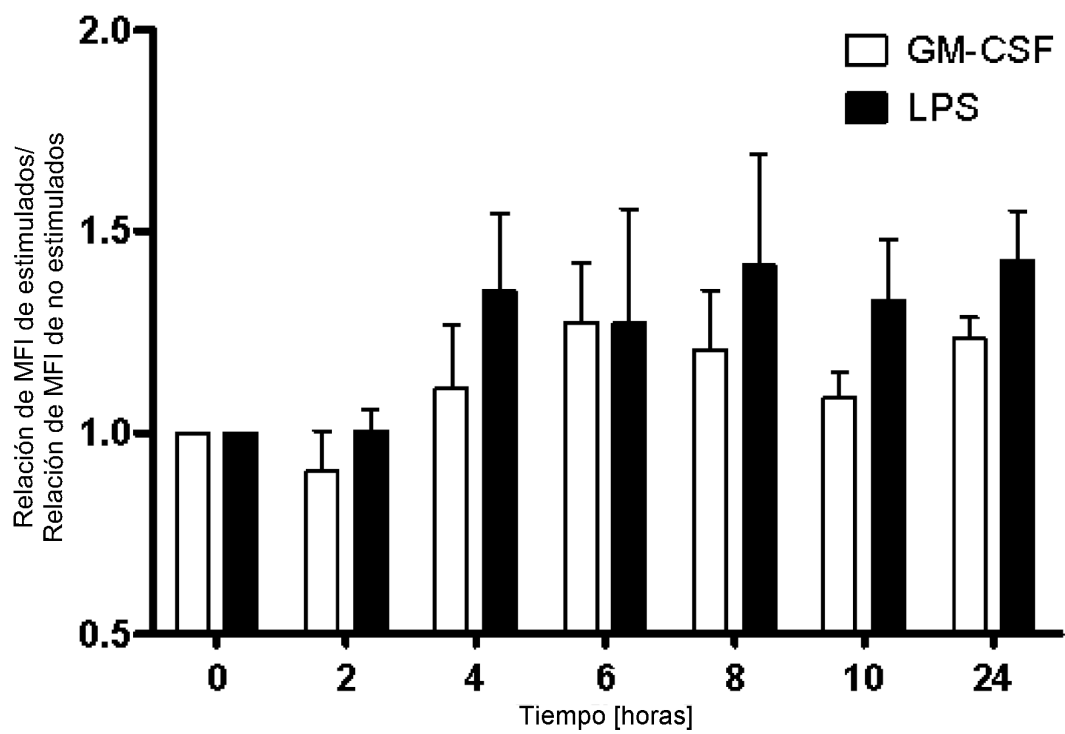


Figura 2

Figura 2A

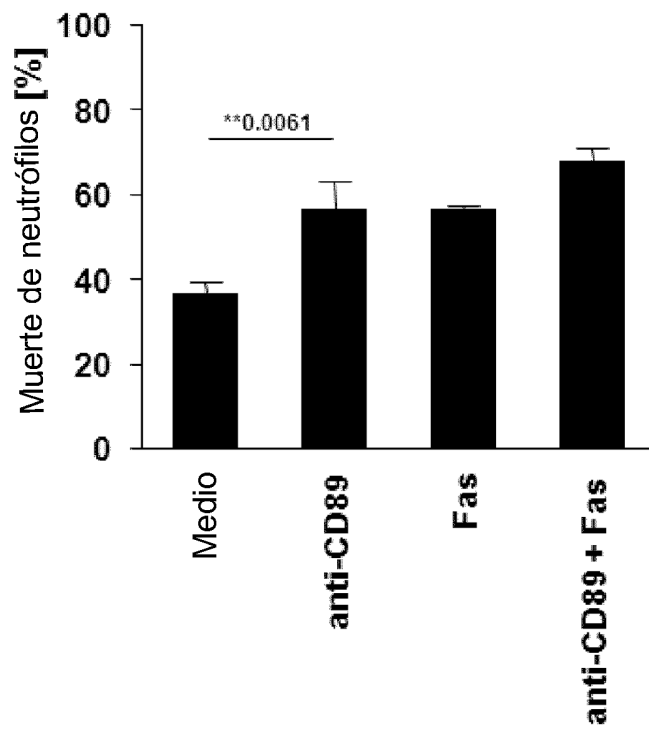


Figura 2B

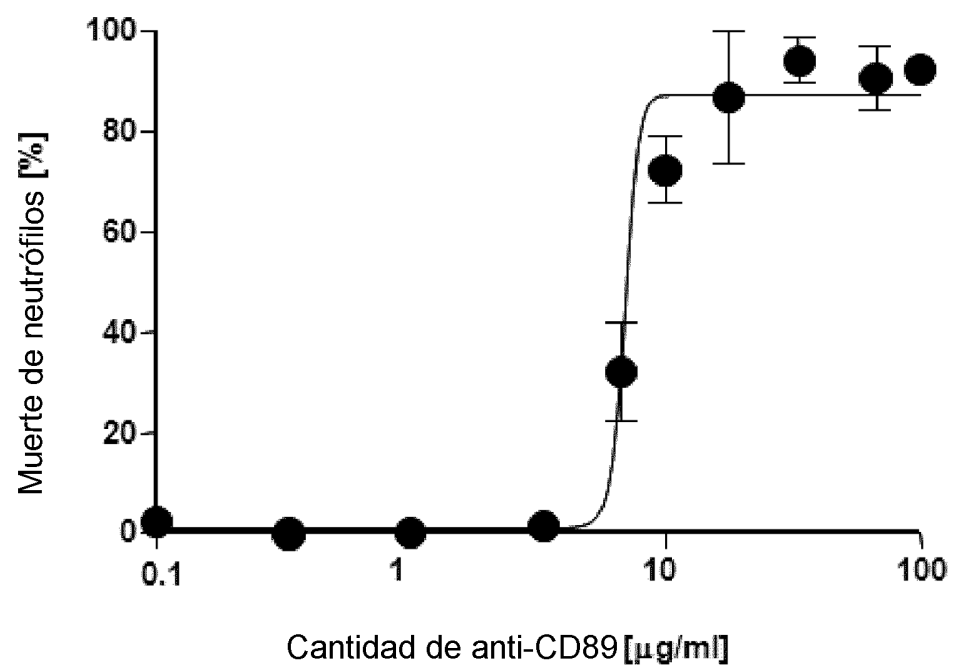


Figura 3A

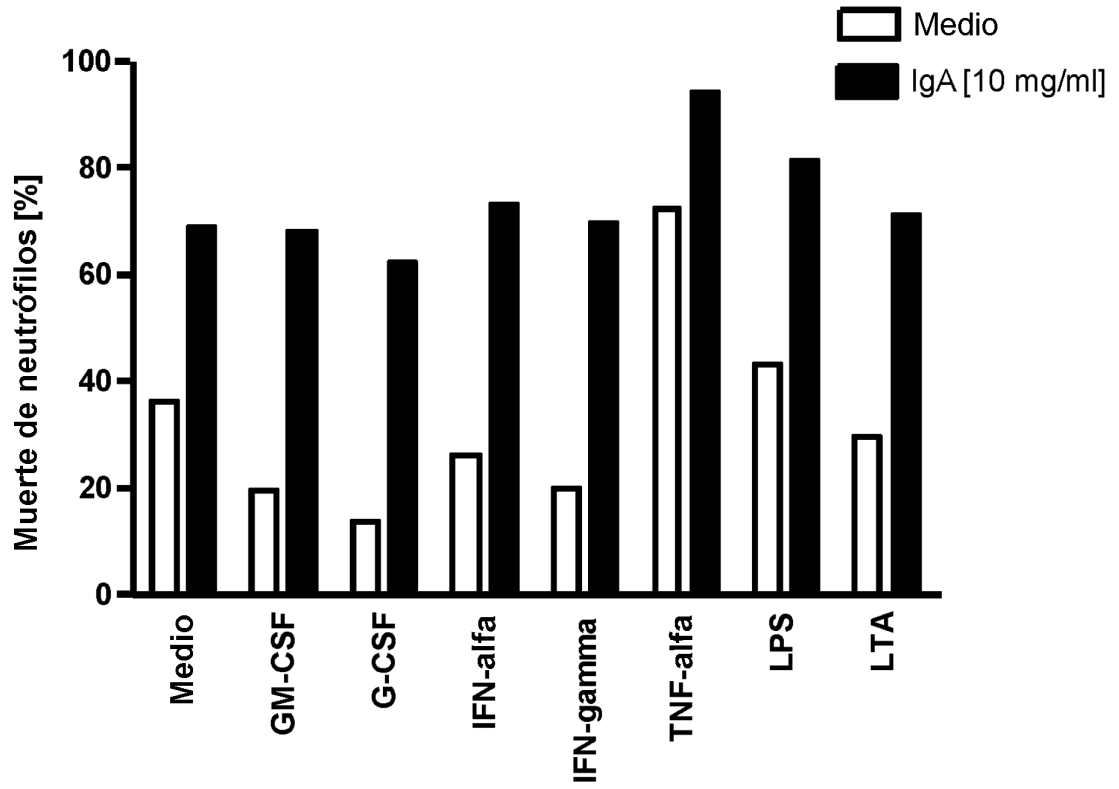


Figura 3B

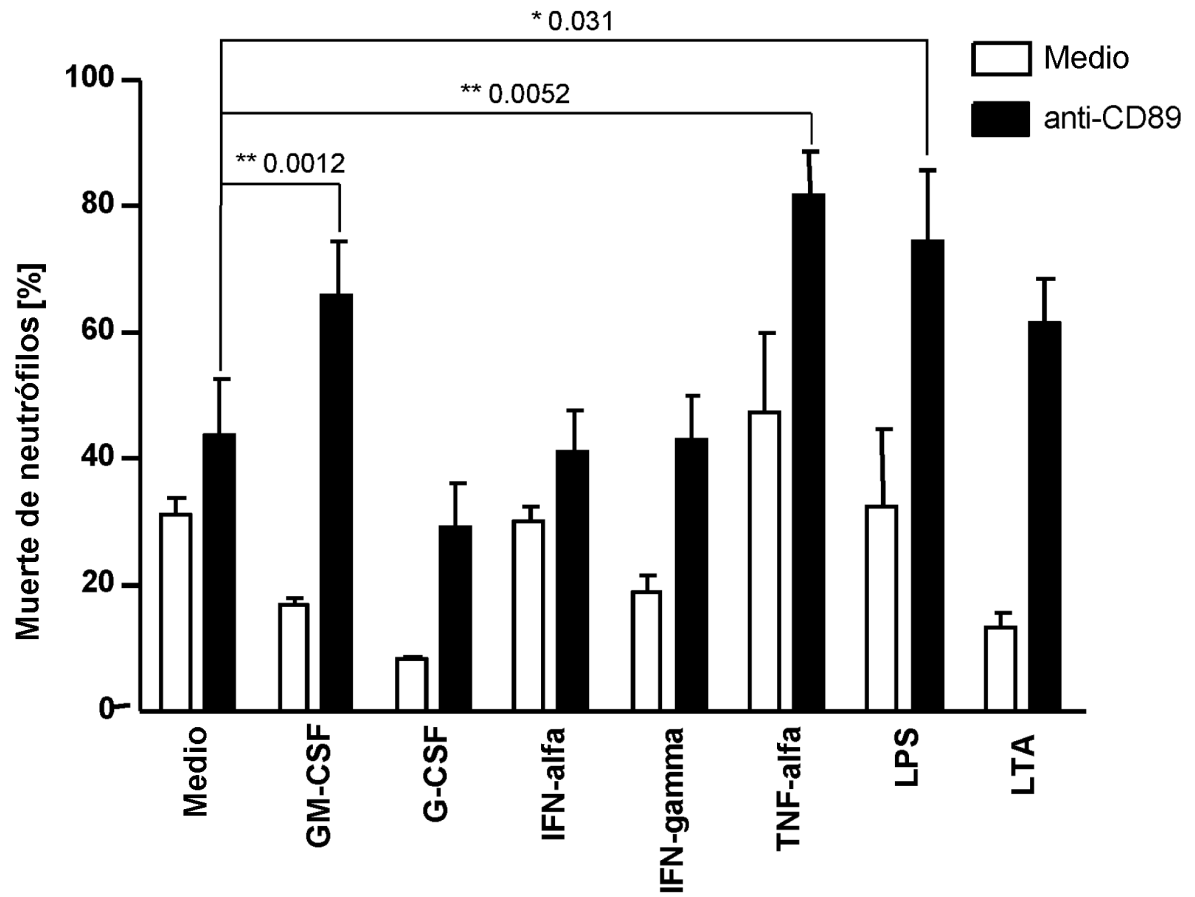


Figura 3C

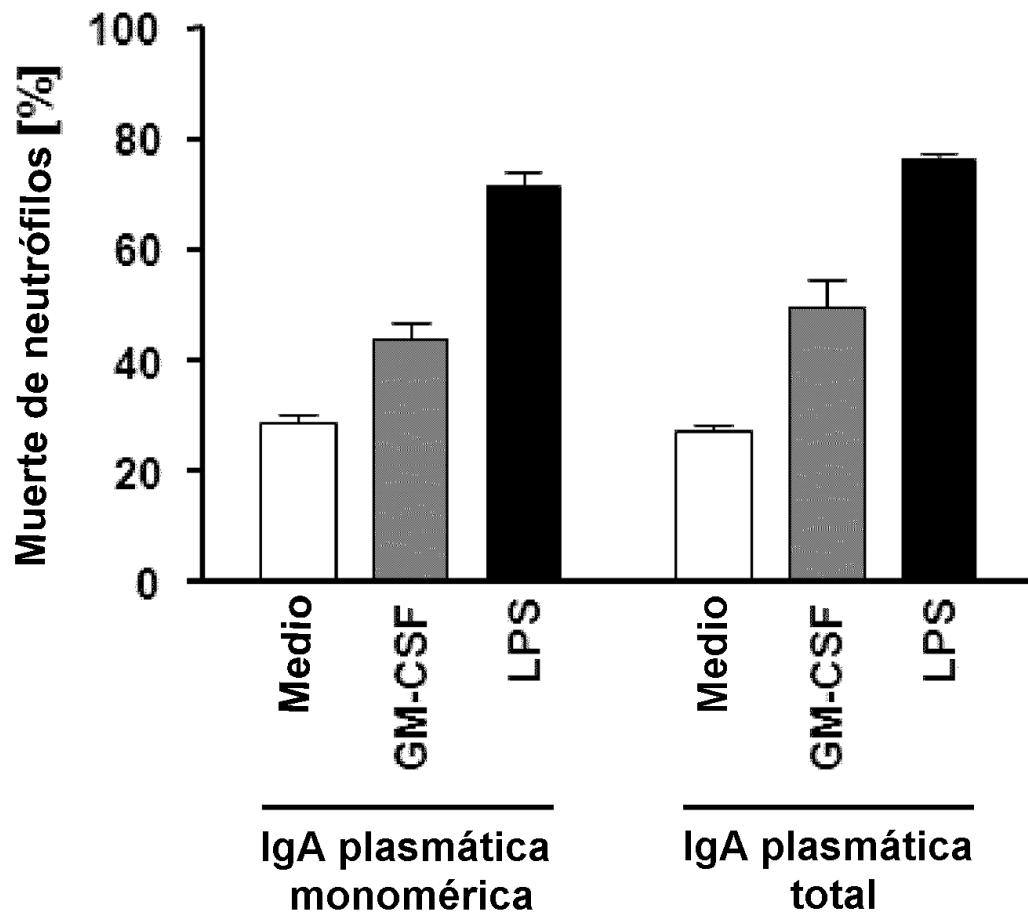


Figura 4

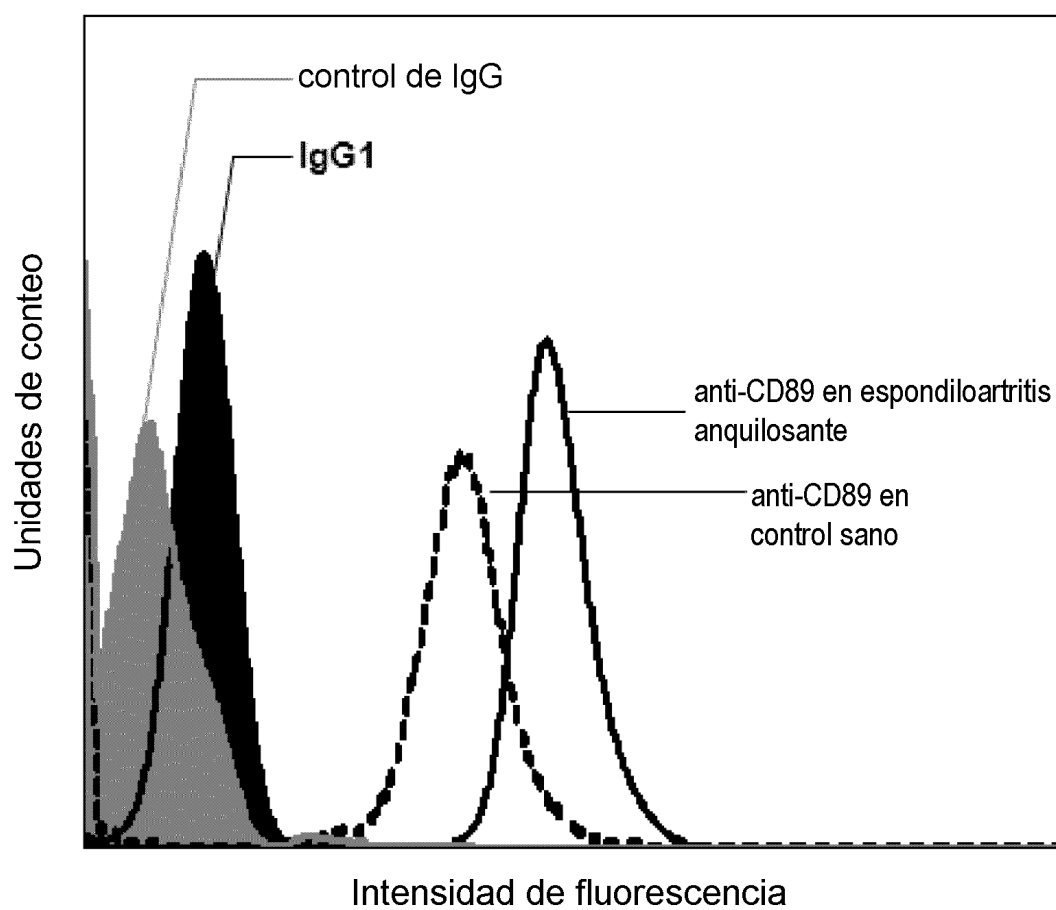


Figura 5A

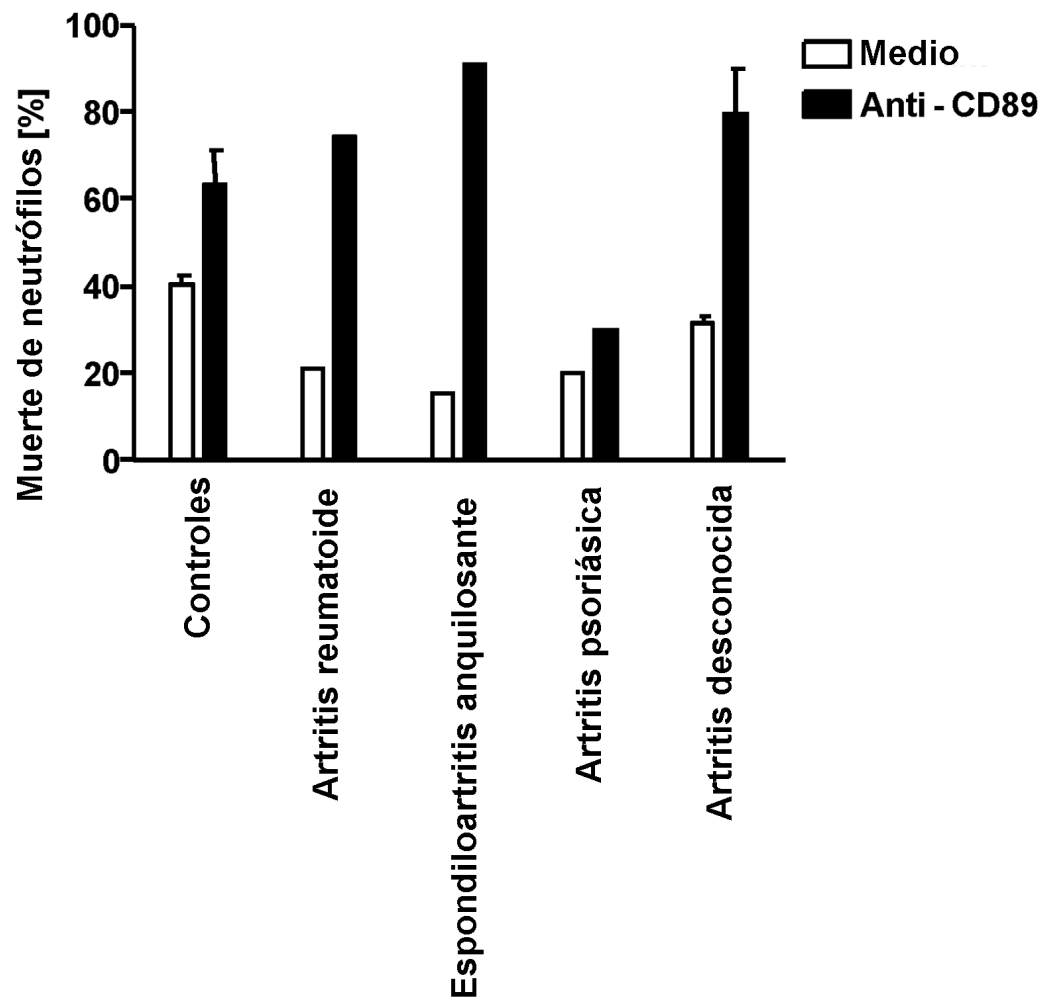


Figura 5B

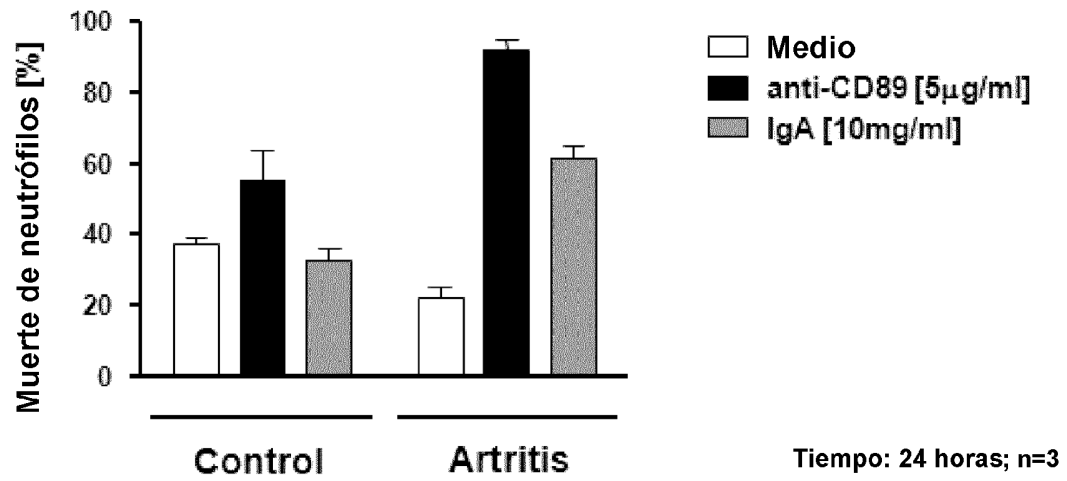


Figura 6

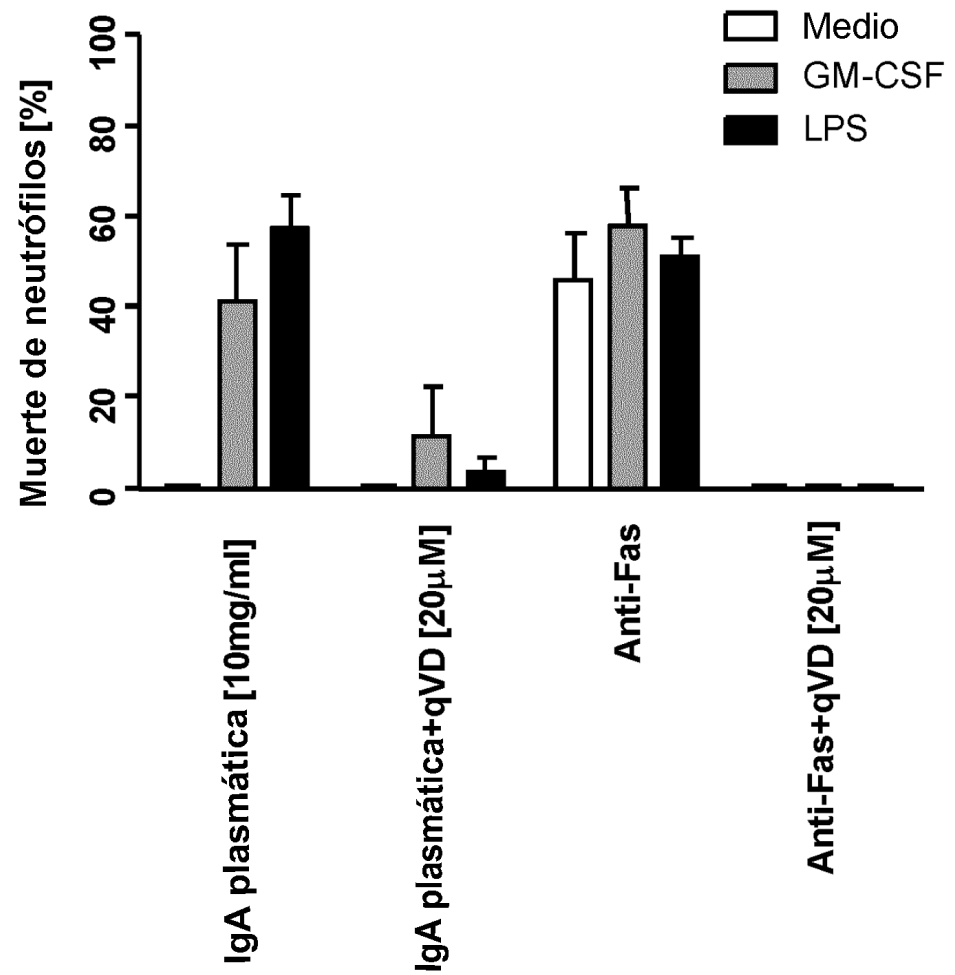


Figura 7A

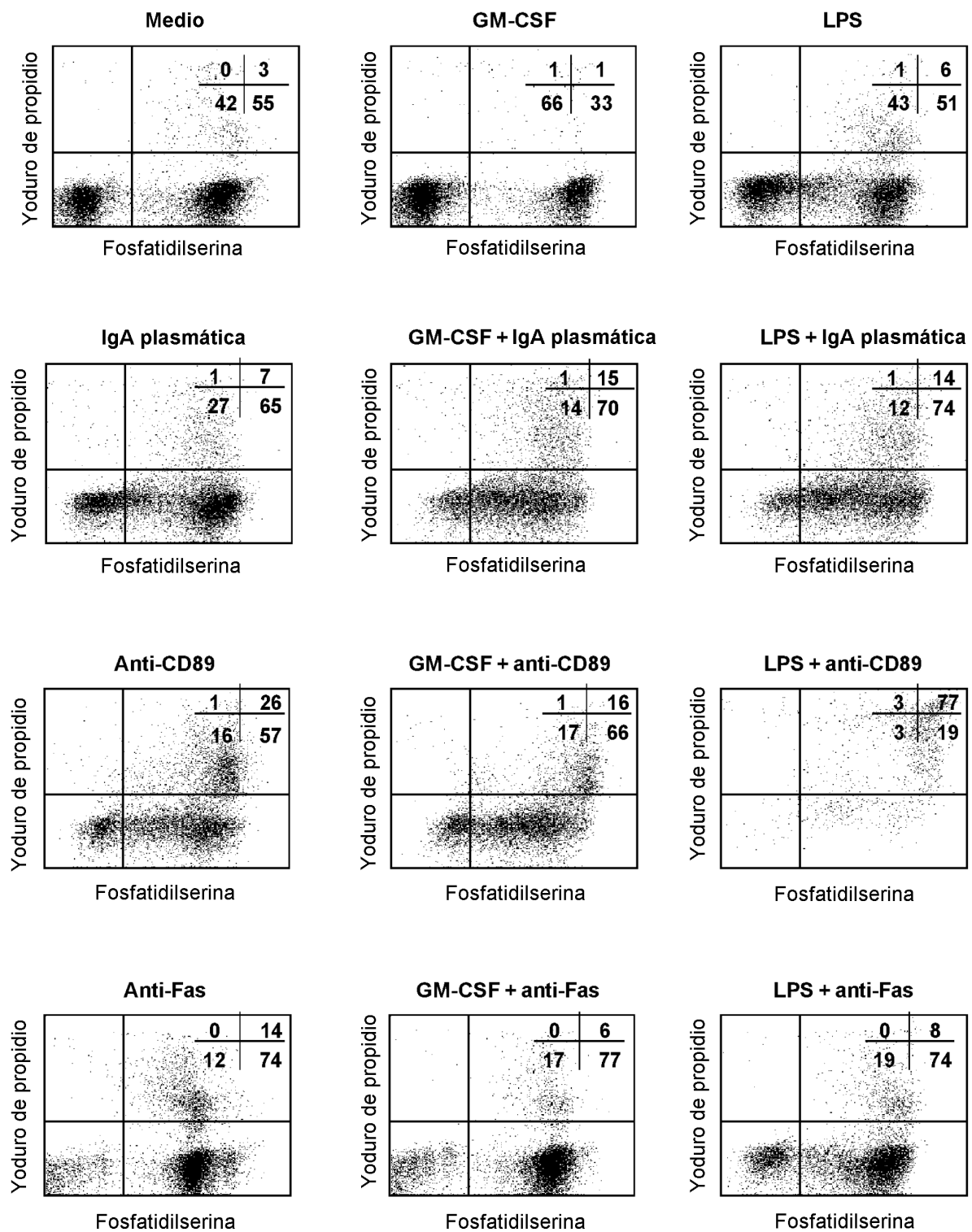


Figura 7B

