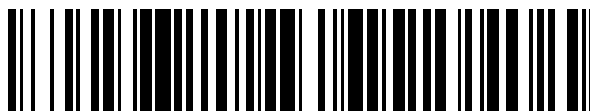


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 740**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2011** **PCT/US2011/051518**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2012** **WO12037196**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2011** **E 11825842 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 2616812**

54 Título: **Métodos de tratamiento de enfermedades autoinmunitarias con anticuerpos anti-FCERI**

30 Prioridad:

14.09.2010 US 382541 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2019

73 Titular/es:

**THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR
THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE,
INC. (100.0%)
6720-A Rockledge Drive, Suite 100
Bethesda, MD 20817, US**

72 Inventor/es:

**MITRE, EDWARD, E. y
HÜBNER, MARC, P.**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 699 740 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de tratamiento de enfermedades autoinmunitarias con anticuerpos anti-FCεRI

5 Declaración de interés gubernamental

La presente invención surgió en parte de una investigación financiada con subvenciones R073MX de la Uniformed Services University of the Health Sciences y 1 DP2DK083131 de los Institutos Nacionales de la Salud. El gobierno de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos sobre esta invención.

10 Antecedentes

La carga de la enfermedad de las más de 80 enfermedades autoinmunitarias distintas en los Estados Unidos es enorme, afectando colectivamente a entre 14 y 22 millones de personas, aproximadamente de un 5 a un 8 % de la población de los Estados Unidos.

La inmunosupresión es la terapia de elección para la mayoría de las enfermedades autoinmunitarias. Los agentes convencionales que inducen inmunosupresión no específica, como los antiinflamatorios no esteroideos, los glucocorticoides y el metotrexato han sido tradicionalmente el pilar de la terapia para muchas enfermedades autoinmunitarias. Si bien son útiles, estos medicamentos no siempre son completamente eficaces y se asocian con una toxicidad significativa cuando se usan crónicamente. Además, al suprimir no específicamente el sistema inmunitario, estos medicamentos aumentan sustancialmente la susceptibilidad del paciente a las infecciones.

En los últimos años, se han desarrollado varios medicamentos nuevos que pueden dirigirse específicamente a ciertos grupos de la respuesta inmunitaria. Si bien estos enfoques representan claramente un paso adelante en el enfoque de la terapia inmunosupresora, ninguno lo hace de una manera específica para el antígeno. En consecuencia, estos nuevos medicamentos aumentan aún más la susceptibilidad del paciente a las infecciones, aunque a una variedad de organismos más pequeño que los agentes inmunosupresores no específicos. Este fenómeno se ilustra por los hallazgos recientes de que los inhibidores del factor de necrosis tumoral, a pesar de bloquear la actividad de una sola citocina, aumentan el riesgo de neumonía, infecciones cutáneas graves y reactivación de la tuberculosis previa.

Dado el mayor riesgo de infección que se produce cuando incluso las facetas específicas del sistema inmunitario están inhibidas, una terapia alternativa para las enfermedades autoinmunitarias sería aquella que suprima solo las respuestas inmunitarias autorreactivas. Tal terapia, idealmente, sería eficaz sin comprometer la capacidad del cuerpo para combatir las infecciones. Varias enfermedades autoinmunitarias parecen ser causadas en gran parte por la inflamación determinada por Th1. Los ejemplos incluyen diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide y uveítis posterior. Si bien el paradigma Th1/Th2 ha evolucionado un poco desde su primera descripción en 1986, en general todavía se acepta que las respuestas Th1 y Th2 tienen la capacidad de contrarrestarse entre sí. En particular, la IL-4 suprime la diferenciación de linfocitos T indiferenciados en linfocitos Th1, lo que resulta en una disminución de la producción de citocinas Th1 y una proliferación de linfocitos Th1 disminuida en respuesta a antígenos que inducen Th1. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas modalidades de tratamiento que regulen de forma selectiva las respuestas Th1. Kaplan et al., 2008 (Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol., 122, No 3, páginas 569-573) describe el tratamiento de la urticaria autoinmunitaria crónica con el anticuerpo anti-IgE omalizumab.

Sumario

La presente divulgación proporciona métodos para tratar una enfermedad autoinmunitaria administrando a un sujeto un anticuerpo que se une al receptor Fc εpsilon I (FcεRI) o una IgE. La administración de anticuerpos anti-FcεRI o anti-IgE activa basófilos y mastocitos. Sin pretender estar limitados por ninguna teoría, postulamos que los basófilos y los mastocitos activados pueden proteger contra la enfermedad autoinmunitaria mediada por Th1, por ejemplo, a través de la liberación de histamina o la síntesis de IL-4, de las que se ha demostrado que contrarrestan o suprimen las respuestas inmunitarias determinadas por Th1, o mediante la inducción de vías de retroalimentación negativa que regulan a la baja las respuestas inmunitarias. Los métodos de tratamiento descritos en esta solicitud también pueden llevarse a cabo utilizando un compuesto que no sea un anticuerpo que específicamente active basófilos y/o mastocitos, ya sea por reticulación de IgE o FcεRI, o activando las células a través de una vía independiente de FcεRI. Estos compuestos que no son anticuerpos también pueden formularse en composiciones para su uso en terapia, como se describe en la presente memoria.

La divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria mediada por Th-1 en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a FcεRI o IgE, tratando de ese modo trastorno autoinmunitario. El anticuerpo se administra en una cantidad suficiente para reticular el FcεRI en basófilos y/o mastocitos, activando así los basófilos y/o mastocitos. También es posible lograr los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria utilizando un compuesto, distinto de un anticuerpo, que es capaz de activar específicamente basófilos y mastocitos, ya sea

mediante la reticulación de FcεRI o mediante la reticulación de anticuerpos IgE unidos a estos receptores en basófilos y/o mastocitos, o por medio de una vía independiente de FcεRI.

En una realización, el anticuerpo anti-FcεRI es un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo anti-FcεRI es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En una realización, el FcεRI es un FcεRI humano. En otra realización más, el anticuerpo anti-FcεRI es un anticuerpo IgG. En una realización, el sitio de unión al antígeno del anticuerpo IgG se une al FcεRI.

La enfermedad autoinmunitaria mediada por Th1 se selecciona de diabetes mellitus insulino dependiente tipo 1, esclerodermia, esclerosis múltiple, uveítis posterior, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide. En una realización, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

En otro caso, el anticuerpo anti-FcεRI o anticuerpo anti-IgE se administra de forma crónica al sujeto. La administración crónica comprende administrar el anticuerpo anti-FcεRI o el anticuerpo anti-IgE al sujeto cada semana durante al menos 10 semanas. La administración crónica comprende administrar el anticuerpo anti-FcεRI o el anticuerpo anti-IgE al sujeto una o más veces al día durante al menos 5, 7, 10 o 14 días.

Otro aspecto se refiere a una composición que comprende un anticuerpo anti-FcεRI para uso en terapia. En un caso, la composición comprende un anticuerpo anti-FcεRI o un anticuerpo anti-IgE para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, que incluye una enfermedad autoinmunitaria mediada por Th1, tal como diabetes mellitus insulino dependiente tipo 1, esclerodermia, esclerosis múltiple, uveítis posterior, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide. El anticuerpo anti-FcεRI o anticuerpo anti-IgE es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-FcεRI o anticuerpo anti-IgE es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. El anticuerpo anti-FcεRI o anticuerpo anti-IgE es un anticuerpo IgG o un anticuerpo IgE. El sitio de unión al antígeno del anticuerpo IgG se une al FcεRI. El sitio de unión al antígeno del anticuerpo IgE se une a un autoantígeno. La composición comprende opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran ciertas realizaciones y, junto con la descripción escrita, sirven para explicar ciertos principios de los anticuerpos y métodos divulgados en la presente memoria.

Figura 1: Anti-FcεRI activa basófilos y mastocitos *in vitro* (A). Tinción de May-Grunwald de mastocitos peritoneales después del enriquecimiento por centrifugación de densidad. (B) Liberación de histamina de los mastocitos en respuesta a concentraciones crecientes de anti-FcεRI. (C) Representaciones de puntos representativas de tinción intracelular de IL-4 de basófilos después de la incubación con medios o anti-FcεRI. Regulación inicial de los linfocitos y la mitad inferior de la región de los granulocitos en el gráfico FS/SS (panel izquierdo). Basófilos identificados como CD4-B220-IgE+ (panel central). Tinción con IL-4 de basófilos después de la incubación con medio (panel superior derecho) o anti-FcεRI (panel inferior derecho). (D) Porcentajes de basófilos que se tiñen positivamente para IL-4 después de la incubación con medios o anti-FcεRI. (E) Liberación de IL-4 de la sangre completa después de la incubación con anti-FcεRI. Las barras de error indican SEM. Significación estadística evaluada mediante la prueba T pareada de una cola.

Figura 2: Efectos de las inyecciones anti-FcεRI *in vivo*. Porcentajes de leucocitos circulantes que son basófilos (A) y porcentajes de células peritoneales que son mastocitos (B) en ratones un día después de la inyección intraperitoneal de 50 µg de anticuerpo de control de isotipo o anti-FcεRI. (C) Concentración de IL-4 en plasma medida por el ensayo de captura de citocinas *in vivo* un día después de la inyección de anticuerpos anti-FcεRI o de isotipo. (D) Concentración de histamina en plasma 30 minutos después de la inyección del anticuerpo anti-FcεRI o del isotipo. La significación estadística entre los grupos se evaluó mediante la prueba de Mann-Whitney (* <0,05). Los datos combinados de dos experimentos independientes se muestran con 5 animales por grupo y experimento.

Figura 3: El tratamiento con anti-e-FcεRI retrasa la aparición de la diabetes. (A) Niveles medios de glucosa en sangre y (B) porcentajes de ratones NOD con diabetes durante el tratamiento con inyecciones semanales de 50 µg de anti-FcεRI (n = 9) o anticuerpo de control de IgG (n = 17). (C) Número total medio de islotes pancreáticos de ratones tratados con anti-FcεRI o isotipo a las 16 semanas de edad (9-10 animales por grupo). Los islotes pancreáticos se clasificaron como no infiltrados, peri-insulitis e intra-insulitis con menos del 50 % o más de 50 % de linfocitos infiltrados. (D) Niveles de glucosa en sangre y (E) porcentajes de ratones diabéticos que recibieron inyecciones semanales de 50 µg de anti-FcεRI durante cuatro semanas o inyecciones de 25 o 50 µg de anti-FcεRI dos veces por semana durante cuatro semanas (n = 8 por grupo) o controles de isotipo (n = 11). Las barras de error indican el EEM. La significación estadística entre los grupos se evaluó mediante la prueba de Mann-Whitney (* <0,05). Se muestran los resultados de 2-3 experimentos independientes.

Figura 4: Respuesta de citocinas y anticuerpos después de 10 semanas de tratamiento con anti-FcεRI/isotipo a las 16 semanas de edad. Producción de citocinas (A) IFNγ, (B) IL-4 y (C) IL-5 a partir de células de bazo y producción de citocinas (D) IFNγ y (E) IL-5 a partir de células de ganglios linfáticos pancreáticos en respuesta a anti-CD3/anti-CD28. (F) Frecuencia de linfocitos T CD4+IFNγ+ esplénicos y (G) CD8+IFNγ+, así

como (H) CD4+IL-4+ e (I) CD4+IL-17+ en respuesta a anti-CD3/anti-CD28. (J) Niveles plasmáticos de IgG1 específica de insulina y (K) IgG2c. La significación estadística entre los grupos se evaluó mediante la prueba de Mann-Whitney. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes con un total de 9-10 animales por grupo.

Figura 5: Frecuencia de linfocitos T reguladores CD4+CD25+FoxP3+ y producción de IL-10 después de 10 semanas de tratamiento con anti-FcεRI/isotipo a las 16 semanas de edad. (A) Frecuencia de linfocitos T reguladores CD4+CD25+FoxP3+ de ganglios linfáticos esplénicos y (B) pancreáticos en respuesta a anti-CD3/anti-CD28. (C) Frecuencia de linfocitos B reguladores CD8+FoxP3+ esplénicos espontáneos, (D) linfocitos B IL-10+ estimulados con anti-CD3/anti-CD28, y (E) linfocitos B reguladores B220+CD5+CD1d+. (F) Liberación de IL-10 del bazo, así como (G) de células de ganglios linfáticos pancreáticos en respuesta a anti-CD3/anti-CD28. La significación estadística entre los grupos se evaluó mediante la prueba de Mann-Whitney (bazo: 9-10 animales por grupo, ganglios linfáticos pancreáticos: 6 animales por grupo, linfocitos reguladores CD8+ y B: 4 animales por grupo). Se muestran los resultados de dos experimentos independientes.

Figura 6: El bloqueo del receptor de histamina no disminuye el retraso mediado por anti-FcεRI del inicio de la diabetes. (A) pH estomacal de animales tratados durante 2 semanas con los bloqueadores del receptor de histamina cimetidina y fexofenidina (5 animales por grupo). (B) Imágenes representativas de ratones que fueron inyectados i.v. con toluidina azul después de la estimulación con un anticuerpo anti-FcεRI (MAR-I) (oreja izquierda) y control de IgG (oreja derecha). El ratón inferior se trató con fexofenidina, un bloqueador del receptor de histamina 1, mientras que el ratón superior es un control no tratado. (C) Niveles de glucosa en sangre y (D) porcentaje de ratones NOD diabéticos que se inyectaron semanalmente con 50 µg de un anticuerpo anti-FcεRI (MAR-I) o un anticuerpo de control de IgG y recibieron administración continua de bloqueadores del receptor de histamina. Las barras de error indican SEM. La significación estadística entre los grupos se evaluó mediante la prueba de Mann-Whitney (*<0,05). Se muestran los resultados de dos experimentos independientes.

Figura 7: La deficiencia de IL-4 reduce el efecto protector mediado por anti-FcεRI. (A) Niveles de glucosa en sangre y (B) Porcentaje de ratones NOD con deficiencia de IL-4 diabéticos que se inyectaron semanalmente con 50 µg de un anticuerpo anti-FcεRI (MAR-I) o un anticuerpo de control de IgG. Las barras de error indican SEM. La significación estadística entre los grupos se evaluó mediante la prueba de Mann-Whitney (*<0,05). Se muestran los resultados de cuatro experimentos independientes.

Figura 8: La administración más frecuente de anti-FcεRI aumenta las tasas de supervivencia en ratones NOD incluso después del desarrollo de autoanticuerpos. Esta figura muestra el porcentaje de supervivencia en ratones NOD hembra a los que se administró diariamente inyecciones i.p. de 5 µg de anti-FcεRI (línea superior, círculos), anticuerpo de control de isotipo (línea media, rombos), o ninguna inyección (línea de fondo, cuadrados) durante 10 días a partir de las 12 semanas de edad. n = 5 por grupo.

Descripción detallada

Ahora se hará referencia en detalle a varios ejemplos de realizaciones, ejemplos que se ilustran en los dibujos adjuntos. Debe entenderse que la siguiente descripción detallada se proporciona para proporcionar al lector una comprensión más completa de ciertas realizaciones, características y detalles de aspectos de la invención, y no debe interpretarse como una limitación del alcance de la invención. El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente a título informativo.

1. Definiciones

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

El término “**anticuerpo**” como se usa en esta divulgación se refiere a una inmunoglobulina o a un fragmento de unión al antígeno de la misma. El término incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, humanos, monocatenarios, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, injertados y generados *in vitro*. El anticuerpo puede incluir una región constante, o una porción del mismo, como los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu. Por ejemplo, se pueden usar regiones constantes de la cadena pesada de los diversos isotipos, que incluyen: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgA₁, IgA₂, IgD, e IgE. A modo de ejemplo, la región constante de la cadena ligera puede ser kappa o lambda.

Las expresiones “**dominio de unión al antígeno**” y “**fragmento de unión al antígeno**” se refieren a una parte de una molécula de anticuerpo que comprende aminoácidos responsables de la unión específica entre el anticuerpo y el antígeno. Para ciertos antígenos, el dominio de unión al antígeno o el fragmento de unión al antígeno solo pueden unirse a una parte del antígeno. La parte del antígeno que es específicamente reconocida y que se une a anticuerpo se conoce como el “epítipo” o “determinante antigénico”. Los dominios de unión al antígeno y los fragmentos de unión al antígeno incluyen Fab (Fragment antigen-binding, Fragmento de unión al antígeno), un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; Fragmento Fv; un fragmento Fv de una sola cadena (scFv) ver por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl Acad Sci. USA 85: 5879-5883; un fragmento Fd que tiene los dos dominios V_H y C_H1; dAb

(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), y otros fragmentos de anticuerpos que retienen la función de unión al antígeno. El fragmento Fab tiene dominios V_H - C_{H1} y V_L - C_L covalentemente unidos por un enlace disulfuro entre las regiones constantes. El fragmento F_v es más pequeño y tiene dominios V_H y V_L no unidos covalentemente. Para superar la tendencia de los dominios no covalentemente unidos a disociarse, se puede construir un scF_v . El scF_v contiene un polipéptido flexible que une (1) el extremo C de V_H con el extremo N de V_L , o (2) el extremo C de V_L con el extremo N de V_H . Se puede usar un péptido de 15 unidades (Gly_4Ser)₃ como un enlazador, pero otros enlazadores son conocidos en la técnica. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se evalúan para determinar su funcionamiento de la misma manera que los anticuerpos intactos.

La expresión “**cantidad efectiva**” se refiere a una dosis o cantidad que es suficiente para tratar una enfermedad o afección indicada.

La expresión “**anticuerpo humano**” incluye anticuerpos que tienen regiones constantes y variables que corresponden sustancialmente a las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas en la técnica, incluidas, por ejemplo, las descritos por Kabat et al. (Ver Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU., Publicación NIH N.º 91-3242). Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio) *in vitro* o por mutación somática *in vivo*, por ejemplo, en las CDR, y en particular, CDR3. El anticuerpo humano puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más posiciones reemplazadas con un resto de aminoácido que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana.

Los términos “**tratamiento**” o “**tratar**” y similares se refieren a cualquier tratamiento de cualquier enfermedad o afección en un mamífero, p. ej. particularmente un ser humano o un ratón, e incluye inhibir una enfermedad, afección o síntoma de una enfermedad o afección, por ejemplo, detener su desarrollo y/o retrasar su aparición o manifestación en el paciente o aliviar una enfermedad, afección o síntoma de una enfermedad o afección, por ejemplo, provocando la regresión de la afección o enfermedad y/o sus síntomas.

Los términos “**sujeto**”, “**hospedador**”, “**paciente**” e “**individuo**” se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a cualquier sujeto mamífero para el que se desee un diagnóstico o una terapia, particularmente los seres humanos.

La expresión “**vehículo farmacéuticamente aceptable**” o “**excipiente farmacéuticamente aceptable**” significa disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica.

El término “**aislado**” cuando se usa en el contexto de un anticuerpo, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente celular o tisular de la que se derivó. El término también se refiere a preparaciones en las que la proteína aislada es suficientemente pura para composiciones farmacéuticas; o al menos 70-80 % (p/p) puro; o al menos 80-90 % (p/p) puro; o al menos 90-95 % puro; o al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % (p/p) puros.

Como se entiende en la técnica, la expresión “**enfermedad autoinmunitaria mediada por Th1**” significa una enfermedad autoinmunitaria que está asociada con una respuesta de linfocitos T cooperadores de tipo 1 (Th1). Dichas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, diabetes mellitus insulino dependiente tipo 1, esclerodermia, esclerosis múltiple, uveítis posterior, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide.

La expresión “**administrado crónicamente**” o similar significa que el anticuerpo u otra molécula se administra al sujeto al menos tan frecuentemente como una vez a la semana durante al menos 10 semanas o al menos tan frecuentemente como una o más veces al día durante al menos 5 días.

La expresión “**cantidad suficiente para reticular el FcεRI**” se refiere a una cantidad de un compuesto, como un anticuerpo anti-FcεRI o un anticuerpo anti-IgE, que es suficiente para reticular y agregar el FcεRI en basófilos y/o mastocitos, de manera que los basófilos y/o mastocitos se estimulen para liberar IL-4 o histamina. La liberación de IL-4 o histamina se puede medir utilizando técnicas conocidas en la técnica, incluidas las divulgadas en esta solicitud.

2. Respuestas inmunitarias de Th1/Th2

Las respuestas de los linfocitos T cooperadores CD4 a los antígenos se pueden clasificar en función de las citocinas que producen. Los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) producen citocinas inflamatorias, como IFN-γ, IL-2, TNF-α y TNF-β. Los linfocitos Th1 activan los macrófagos y se asocian con respuestas inmunitarias mediadas por células. Los linfocitos cooperadores tipo 2 (Th2), por otro lado, suelen producir citocinas, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Los

linfocitos Th2 activan los linfocitos B y están asociados con respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpos.

3. Enfermedades autoinmunitarias

Las enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por respuestas inmunitarias hiperactivas a los antígenos propios expresados en las células. En esencia, el sistema inmunitario confunde un autoantígeno en el cuerpo como un patógeno y organiza un ataque contra la célula o el tejido que expresa el antígeno propio. Las enfermedades autoinmunitarias por lo general implican respuestas autoinmunitarias crónicas, que conducen a daño tisular a largo plazo. Varias enfermedades autoinmunitarias parecen ser causadas en gran parte por la inflamación determinada por Th1 basada, en parte, en los perfiles de citocinas, que incluyen niveles predominantemente altos de IFN- γ . Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias mediadas por Th1 incluyen, pero no se limitan a, diabetes mellitus insulino dependiente tipo 1, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide y uveítis posterior.

4. Terapia anti-Fc ϵ RI para enfermedades autoinmunitarias

La prevalencia de la diabetes tipo 1 y otras enfermedades autoinmunitarias ha aumentado considerablemente en las últimas décadas (1-6). Si bien los factores genéticos desempeñan un papel en la susceptibilidad a la diabetes tipo 1, el dramático aumento mundial de la prevalencia de la diabetes tipo 1 probablemente se deba a cambios en los factores ambientales.

Un cambio ambiental que puede desempeñar un papel en el reciente aumento de las enfermedades autoinmunitarias es la pérdida de infecciones crónicas parasitarias por gusanos en los países desarrollados. Varios estudios han determinado que los individuos infectados con infecciones crónicas parasitarias por gusanos tienen tasas más bajas de enfermedades autoinmunitarias que otros que viven en el mismo entorno (revisado en (7)). Experimentalmente, se ha demostrado que los gusanos parasitarios protegen contra la diabetes tipo 1 y otras enfermedades autoinmunitarias en varios modelos animales (8-10), y en humanos, la administración oral de huevos de látigo porcino está asociada a la protección contra la enfermedad inflamatoria intestinal (11).

Hasta hace poco, la mayoría de las personas tenían infecciones de por vida con gusanos parasitarios. Como en las momias neolíticas y precolombinas se han identificado helmintos (12, 13), es probable que el sistema inmunitario humano haya evolucionado en el contexto de una infección crónica con estos parásitos (14). En consecuencia, se ha afirmado que la pérdida de infecciones parasitarias por gusanos es en parte responsable del aumento de la prevalencia de enfermedades autoinmunitarias y alérgicas en los países desarrollados. La noción es que ahora, en ausencia de las respuestas inmunomoduladoras provocadas por los helmintos, nuestro sistema inmunológico se ha vuelto hipersensible (9, 14, 15).

A diferencia de la mayoría de los patógenos bacterianos o virales, las infecciones por helmintos inducen la producción de IgE específica. Esta IgE se une a los basófilos y mastocitos a través del receptor Fc ϵ I (Fc ϵ RI), el receptor de alta afinidad de IgE (51). Los antígenos específicos de helmintos pueden activar basófilos y mastocitos mediante la reticulación de moléculas de IgE y la agregación de Fc ϵ RI. Como los helmintos son organismos grandes que liberan cantidades sustanciales de antígeno, y como estas infecciones duran años, es probable que las infecciones por helmintos induzcan un estado crónico de activación de basófilos y mastocitos. De hecho, estudios recientes en nuestro laboratorio demuestran que tanto la activación crónica de basófilos (18) como la activación crónica de mastocitos (E. Mueller, E. Mitre, datos no publicados) se producen durante la infección de ratones con el nematodo filarial *Litomosoides sigmodontis*.

Sin pretender estar limitados por ninguna teoría, existen al menos dos razones mecanicistas probables para postular que la activación crónica de basófilos y mastocitos puede proteger contra la enfermedad autoinmunitaria determinada por Th1. Primero, los factores liberados por los basófilos y los mastocitos pueden tener propiedades inmunomoduladoras directas que protegen contra las enfermedades autoinmunitarias mediadas por Th1. Los basófilos, por ejemplo, liberan grandes cantidades de IL-4 cuando se activan y se ha demostrado que lo hacen en respuesta al antígeno parásito en pacientes infectados por filaria (17), así como en modelos animales de infección por helmintos (18-21). Como la destrucción de las células de los islotes β en la diabetes tipo 1 está determinada por la liberación de IFN- γ de los linfocitos Th1, y como el contador de IL-4 regula las respuestas de Th1 y se ha demostrado que mejora las enfermedades autoinmunitarias determinadas por Th1 (22, 23), la activación crónica de los basófilos puede proteger contra la diabetes tipo 1 mediante la liberación de IL-4. De manera similar, la histamina, que se libera tanto de los basófilos como de los mastocitos, se ha demostrado que inhibe *in vitro* las respuestas Th1 mediante la señalización a través del receptor H2 en los linfocitos (24). Alternativamente, la activación crónica de basófilos y mastocitos podría inducir vías de retroalimentación negativa que reprimen las respuestas autoinmunitarias en curso. Curiosamente, existe evidencia sustancial de que la inmunoterapia crónica, en la que a los pacientes con alergias mediadas por IgE se les administran inyecciones semanales de alérgeno, aumenta las redes de regulación inmunitaria, como la citocina supresora IL-10 y los linfocitos T reguladores naturales (25, 26).

Para determinar si la recapitulación de las respuestas inmunitarias mediadas por IgE inducidas por helmintos puede ofrecer protección contra la autoinmunidad en ausencia de infección real, se activaron basófilos y mastocitos en

ratones diabéticos no obesos (NOD) utilizando un anticuerpo anti-FcεRI. Los ratones NOD desarrollan espontáneamente diabetes tipo 1 (también conocida como diabetes mellitus insulino dependiente), una forma de diabetes que se desarrolla a partir de la destrucción autoinmunitaria de las células beta de los islotes productores de insulina. Los ratones NOD son un modelo animal reconocido en la técnica para la diabetes tipo 1 (50).

Para activar basófilos y mastocitos *in vivo*, los ratones NOD se trataron con inyecciones semanales o diarias de anticuerpo anti-FcεRI. Los experimentos *in vitro* demostraron que el anti-FcεRI activa tanto los basófilos como los mastocitos. Las inyecciones intraperitoneales de anti-FcεRI dieron como resultado la liberación de grandes cantidades de IL-4 e histamina en el torrente sanguíneo, lo que concuerda con la activación de basófilos y mastocitos *in vivo*, y dio lugar a un cambio de Th2 en la producción de anticuerpos específicos de insulina. Si bien la producción de IL-10 y las frecuencias de linfocitos T reguladores CD4+CD25+FoxP3+ de los ganglios linfáticos esplénicos y pancreáticos no se alteraron significativamente, ambos parámetros mostraron una tendencia mayor en los animales tratados con anti-FcεRI. De acuerdo con nuestra hipótesis, los ratones NOD tratados con anti-FcεRI mostraron retrasos significativos en el inicio de la diabetes autoinmunitaria y mejoraron sustancialmente las tasas de supervivencia de los ratones NOD. Las respuestas de IL-4 parecen jugar un papel parcial subyacente a este fenómeno, ya que el efecto protector provocado por la terapia anti-FcεRI disminuyó en ratones NOD deficientes en IL-4. Por el contrario, la señalización de la histamina a través de los receptores H1 y H2 no parece desempeñar un papel, ya que la protección mediada por anti-FcεRI no se redujo en los ratones tratados con bloqueadores de los receptores H1 y H2.

Estos resultados demuestran que la terapia anti-FcεRI puede retrasar la aparición de diabetes tipo I en ratones NOD y sugiere que la activación crónica de basófilos y mastocitos representa una nueva vía de terapia para las enfermedades autoinmunitarias asociadas a Th1.

5. Receptor Fc εpsilon I

Como ya se ha señalado anteriormente, FcεRI es un complejo receptor expresado en mastocitos y basófilos. El complejo de FcεRI tetramérico comprende una subunidad FcεRIα combinada con una subunidad β y dos γ. El complejo FcεRI se une a la porción Fc de los anticuerpos IgE y, por lo tanto, desempeña un papel importante en el desencadenamiento de reacciones alérgicas mediadas por IgE. La unión de los anticuerpos anti-FcεRI a FcεRI en la superficie de los mastocitos y/o basófilos conduce a la reticulación de FcεRI. La reticulación de FcεRI a su vez da como resultado la desgranulación de los mastocitos y/o basófilos, estimulando la liberación de aminas vasoactivas, como la histamina, y, por lo tanto, imita el efecto de la IgE reticulada unida a FcεRI. Los mastocitos y los basófilos activados también sintetizan y secretan citocinas, como la IL-4, que contribuyen a la reacción inflamatoria local. Como se señaló anteriormente, la IL-4 es una citocina asociada con los linfocitos Th2 y se ha demostrado que mejora las enfermedades autoinmunitarias determinadas por Th1 (22, 23).

6. Anticuerpos anti-FcεRI

Esta divulgación proporciona anticuerpos que se unen a FcεRI o anticuerpos que se unen a IgE para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1. Los anticuerpos proporcionados en esta divulgación que se unen a FcεRI están opcionalmente aislados. En una realización preferida, los anticuerpos se unen al FcεRI humano. Los anticuerpos anti-FcεRI pueden unirse al complejo FcεRI o a una subunidad del mismo (FcεRIα, FcεRIβ o FcεRIγ).

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, son generalmente proteínas glicosiladas tetraméricas compuestas por dos cadenas ligeras (L) de aproximadamente 25 kDa cada una y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. Dos tipos de cadenas ligeras, denominadas lambda y kappa, pueden encontrarse en los anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a cinco clases principales: A, D, E, G y M, y varias de estas pueden dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Cada cadena ligera incluye un dominio variable N-terminal (V) (VL) y un dominio constante (C) (CL). Cada cadena pesada incluye un dominio V N-terminal (VH), tres o cuatro dominios C (CH) y una región bisagra. El dominio CH más proximal a VH se designa como CH1. Los dominios VH y VL consisten en cuatro regiones de secuencias relativamente conservadas llamadas regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4), que forman un andamio para tres regiones de secuencias hipervariables (regiones determinantes de la complementariedad, CDR). Las CDR contienen la mayoría de los restos responsables de las interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno. Las CDR se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. Por consiguiente, los constituyentes de CDR en la cadena pesada se denominan H1, H2 y H3, mientras que los constituyentes de CDR en la cadena ligera se denominan L1, L2 y L3. La identificación y numeración de los restos del marco y de las CDR es como se describe en Chothia et al., Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain, J Mol Biol 1998, 278: 457-79.

La CDR3 es generalmente la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión del anticuerpo. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos restos de aminoácidos o tener más de 26 aminoácidos. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas en la técnica. Para una revisión de la estructura de los anticuerpos, ver Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al. 1988. Un experto en la materia reconocerá que cada estructura de

subunidad, por ejemplo, una estructura CH, VH, CL, VL, CDR, FR, comprende fragmentos activos, por ejemplo, la porción de la subunidad VH, VL o CDR que se une al antígeno, es decir, el fragmento de unión al antígeno, o, por ejemplo, la porción de la subunidad CH que se une y/o activa, por ejemplo, un receptor Fc y/o complemento. Las CDR normalmente se refieren a las CDR de Kabat, como se describe en *Secuencias de proteínas de interés inmunológico*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. (1991), eds. Kaba et al. Otro estándar para caracterizar el sitio de unión al antígeno se refiere a los bucles hipervariables como lo describe Chothia. Ver, por ejemplo, Chothia, D. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 799-817; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14: 4628-4638. Otro estándar más es la definición de AbM utilizada por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Ver, en general, por ejemplo, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. En: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Las realizaciones descritas con respecto a las CDR de Kabat pueden implementarse alternativamente utilizando relaciones descritas similares con respecto a los bucles hipervariables de Chothia o a los bucles definidos por AbM.

Se puede preparar una proteína de fusión de anticuerpos que tenga regiones Fc dobles con capacidades de ADL y lisis complementarias mejoradas. Los receptores Fc típicos que se unen a una región Fc de un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo IgG) incluyen, pero no se limitan a, los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII y FcRn, incluidas las variantes alélicas y las formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores de Fc se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92, 1991; Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34, 1994; y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41, 1995).

7. Métodos de fabricación de anticuerpos

Los métodos para fabricar anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, y formular los mismos para la administración terapéutica son bien conocidos como se discutió, por ejemplo, en el documento PCT/US2010/032714.

Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse usando métodos de ADN recombinante. Ver, por ejemplo, los documentos US-4.816.567, EPO 8430268.0; EPO 85102665.8; EPO 85305604.2; PCT/GB85/00392; EPO 85115311.4; PCT/US86/002269; y la solicitud japonesa 85239543.

Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse preparando líneas celulares inmortalizadas capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Dichas líneas celulares inmortalizadas pueden producirse de diversas maneras. Convenientemente, un pequeño vertebrado, como un ratón, se hiperinmuniza con el inmunógeno deseado. A continuación se sacrifica el vertebrado, generalmente varios días después de la inmunización final, se extraen las células del bazo y se immortalizan las células del bazo. La técnica más común es la fusión con una pareja de fusión de células de mieloma, como se describió por primera vez en Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497. Otras técnicas incluyen la transformación de EBV, la transformación con ADN desnudo, por ejemplo, oncogenes, retrovirus, etc., o cualquier otro método que proporcione un mantenimiento estable de la línea celular y la producción de anticuerpos monoclonales. Las técnicas específicas para preparar anticuerpos monoclonales se describen en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Las líneas celulares inmortalizadas pueden seleccionarse utilizando métodos estándar, como el análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el análisis de resonancia de plasmón de superficie (BIACORE™), para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno específico. Se puede usar cualquier forma del antígeno especificado como inmunógeno, p.ej., antígeno recombinante, formas naturales, cualquier variante o fragmento del mismo, así como su péptido antigénico.

Un ejemplo de método para producir anticuerpos incluye el cribado de bibliotecas de expresión de proteínas, p.ej., bibliotecas de presentación de fagos o ribosomas. La expresión de fagos se describe, por ejemplo, en Ladner et al., patente US-5.223.409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317; Clackson et al. (1991) *Nature*, 352: 624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597; los documentos WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; y WO 90/02809.

Además del uso de bibliotecas de expresión, el antígeno especificado (por ejemplo, FcεRI o una subunidad del mismo) se puede usar para inmunizar a un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, hámster o rata. En una realización, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible diseñar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humanos. Usando la tecnología del hibridoma, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos de antígeno derivados de los genes con la especificidad deseada. Ver, por ejemplo, XENOMOUSE™, Green et al. (1994) *Nature Genetics* 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996 y la solicitud PCT N.º PCT/US96/05928, presentada el 29 de abril de 1996.

En otra realización, se obtiene un anticuerpo monoclonal del animal no humano, y luego se modifica. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados, desinmunizados y quiméricos pueden producirse usando técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Se han descrito una variedad de enfoques para producir anticuerpos

químicos. Véase, por ejemplo, Morrison et al., Proc. Natl Acad Sci. U.S.A. 81: 6851, 1985; Takeda et al., Nature 314: 452, 1985, Cabilly et al., patente US-4.816.567; Boss et al., patente US-4.816.397; Tanaguchi et al. Publicación de Patente Europea EP171496; Publicación de Patente Europea 0173494, Patente del Reino Unido GB 2177096B. La humanización de un anticuerpo implica el trasplante del sitio de combinación de un anticuerpo no humano en un anticuerpo humano. Esto se puede realizar injertando las CDR no humanas en el marco humano y, opcionalmente, en regiones constantes humanas o trasplantando los dominios variables no humanos completos pero ocultándolos con una superficie similar a la humana mediante el reemplazo de ciertos restos expuestos. Los detalles sobre la creación de un anticuerpo humanizado se divulgan en la patente US-5.472.693.

Los anticuerpos humanizados también pueden producirse, por ejemplo, utilizando ratones transgénicos que expresan genes de la cadena pesada y ligera humanos, pero son incapaces de expresar los genes de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón endógena. Winter describe un ejemplo de método de injerto de CDR que se puede usar para preparar los anticuerpos humanizados descritos en la presente memoria (patente US-5.225.539). Todas las CDR de un anticuerpo humano particular pueden reemplazarse con al menos una porción de una CDR no humana, o solo algunas de las CDR pueden reemplazarse con CDR no humanas. Solo es necesario reemplazar el número de CDR requeridas para la unión del anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado.

Los anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos pueden generarse reemplazando secuencias del dominio variable Fv que no están directamente implicadas en la unión al antígeno con secuencias equivalentes de dominios variables Fv humanos. Ejemplos de métodos para generar anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos se proporcionan por Morrison (1985) Science 229: 1202-1207; por Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; y por las patentes US-5.585.089; US-5.693.761; US-5.693.762; US-5.859.205; y US-6.407.213. Esos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican la totalidad o parte de los dominios variables Fv de inmunoglobulina de al menos uno de una cadena pesada o ligera. Dichos ácidos nucleicos pueden obtenerse a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada, como se describe anteriormente, así como a partir de otras fuentes. El ADN recombinante que codifica la molécula de anticuerpo humanizado puede clonarse en un vector de expresión apropiado.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado se optimiza mediante la introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia de consenso, sustituciones de la línea germinal y/o retromutaciones. Dichas moléculas de inmunoglobulina alteradas pueden fabricarse por cualquiera de diversas técnicas conocidas en la técnica, (p.ej., Teng et al., Proc. Natl Acad Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., Immunology Today, 4:7279, 1983; Olsson et al., Meth. Enzymol., 92:3-16, 1982), y puede hacerse de acuerdo con las enseñanzas de la publicación PCT WO92/06193 o EP 0239400. Generalmente, se hacen sustituciones conservativas. A menudo, pero no exclusivamente, se puede usar un aminoácido común a una posición en las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana. Las secuencias de la línea germinal humana, por ejemplo, se describen en Tomlinson, et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G. P. et al. (1995) Immunol. Today Vol. 16(5):237-242; Chothia, D. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227: 799-817; y Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14: 4628-4638. El directorio V BASE proporciona un directorio completo de secuencias de región variable de inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, I.A. et al. Centro MRC para la Ingeniería de Proteínas, Cambridge, Reino Unido). Estas secuencias pueden usarse como fuente de secuencia humana, por ejemplo, para regiones marco y CDR. Las regiones del marco humano de consenso también se pueden utilizar, por ejemplo, como se describe en la patente US-6.300.064.

Los anticuerpos humanos pueden generarse usando métodos conocidos en la técnica, tales como la tecnología de presentación de fagos. La tecnología de presentación de fagos imita el sistema inmunitario de los mamíferos mediante la clonación de grandes bibliotecas de genes de anticuerpos y la selección para unirse a una diana deseada, como el FcεRI o una subunidad del mismo. Las bibliotecas utilizadas en la tecnología de presentación de fagos pueden realizarse a partir de varias fuentes. Por ejemplo, una biblioteca inmunológica, creada a partir de seres humanos expuestos a un antígeno deseado mediante la vacunación o la enfermedad, tiene altos niveles de anticuerpos circulantes contra el antígeno, incluso cuando la biblioteca es relativamente pequeña. Como otro ejemplo, una biblioteca de seres humanos no expuestos, constituida por ARNm aislado de individuos no inmunizados, puede usarse repetidamente para aislar anticuerpos contra una variedad de antígenos. Otro ejemplo más, una biblioteca sintética, en la que segmentos de genes de anticuerpos de la línea germinal se clonan y organizan de manera combinatoria *in vitro* para reconstituir genes que codifican cadenas V_H y V_L completas, tiene la ventaja de producir anticuerpos con especificidad a los autoantígenos. También se pueden crear bibliotecas semisintéticas seleccionando uno o más marcos de anticuerpos y secuencias aleatorias dentro de los bucles de CDR.

En la tecnología de presentación de fagos, una vez que se crea una biblioteca, se fusiona con una proteína de superficie de fagos, comúnmente pIII. En un proceso conocido como "panning", los fagos que presentan un anticuerpo específico para el antígeno de interés se enriquecen por adsorción selectiva sobre el antígeno inmovilizado. Posteriormente, el fago unido se puede eluir de la superficie y amplificar a través de la infección de células de *E. coli*.

También se conocen en la técnica otras modificaciones de la tecnología de presentación de fagos para generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden presentar en las superficies de las células

microbianas, como *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, en lugar de sobre la superficie de los bacteriófagos. En este caso, el cribado puede realizarse mediante incubación con un ligando etiquetado con fluorescencia en un tampón. Las células que muestran los anticuerpos que se unen al ligando se marcan de forma fluorescente y se aíslan mediante clasificación de células activadas por fluorescencia. Otra modificación, denominada presentación de ribosomas, se basa en la formación de un complejo ternario entre los ribosomas, el ARNm y el polipéptido.

Otro método conocido en la técnica para producir anticuerpos humanos es el que usa ratones transgénicos. El repertorio de inmunoglobulina nativa en estos ratones ha sido reemplazado por genes V humanos en el cromosoma murino. Los ratones pueden inyectarse con un antígeno deseado y los anticuerpos resultantes pueden recuperarse clonando y seleccionando una biblioteca inmunitaria, o mediante tecnología del hibridoma convencional. Estos ratones producen niveles significativos de anticuerpos completamente humanos que solo difieren en los patrones de glicosilación.

8. Métodos de uso

Los anticuerpos descritos en la presente memoria que se unen a FcεRI se pueden usar en una variedad de aplicaciones médicas y de investigación. En un aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a FcεRI formulado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad autoinmunitaria mediada por Th1, que incluye, entre otras, diabetes mellitus insulino dependiente tipo 1, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide y uveítis posterior.

9. Formulaciones y Administración

La divulgación proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo que se une a FcεRI. En ciertas realizaciones, las composiciones son adecuadas para uso farmacéutico y administración a pacientes. Estas composiciones comprenden un anticuerpo que se une a FcεRI y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionan funciones terapéuticas suplementarias, adicionales o mejoradas. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluirse en un envase, pack o dispensador junto con instrucciones para la administración. En una realización, la composición comprende un anticuerpo monoclonal que se une a FcεRI para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, que incluye una enfermedad autoinmunitaria mediada por Th1, como la diabetes mellitus insulino dependiente tipo 1, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide y uveítis posterior.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Los expertos en la materia conocen métodos para llevar a cabo la administración. Esto incluye, por ejemplo, inyecciones, por vía parenteral como intravenosa, intravascular, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intratumoral, intraperitoneal, intraventricular, intraepidural u otras, así como oral, nasal, oftálmica, rectal o tópica. La administración de liberación sostenida también se contempla específicamente, por medios tales como inyecciones de depósito o implantes erosionables. Se contempla particularmente la administración localizada, por medios tales como la administración a través de un catéter a una o más arterias, como la arteria renal o un vaso que irriga un tumor localizado.

En un caso, un anticuerpo objeto se administra a un paciente mediante inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). El anticuerpo puede administrarse, por ejemplo, por inyección de bolo o por infusión lenta. Se puede usar una infusión lenta durante un período de 30 minutos a 2 horas. Generalmente, para la administración de anticuerpos anti-FcεRI, una dosis candidata inicial puede ser de aproximadamente 5 a 100 µg/kg (0,005-0,1 mg/kg). Una dosis diaria típica puede variar de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg; de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg; o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. La dosis adecuada del anticuerpo anti-FcεRI dependerá de varios factores, incluido el anticuerpo utilizado (o las composiciones del mismo), la vía de administración, la frecuencia de administración, la salud, la edad o la constitución del paciente, el tipo y la gravedad de la enfermedad a tratar, si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y a discreción del médico responsable del tratamiento. Generalmente, el médico administrará un anticuerpo anti-FcεRI hasta que se alcance una dosis que logre el resultado deseado.

Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas o hasta que se alcanzan niveles terapéuticos suficientes del anticuerpo. Un régimen posológico ilustrativo comprende administrar una dosis diaria de aproximadamente 5-100 µg/kg durante aproximadamente 5-14 días (o más), con o sin dosis de mantenimiento semanales de aproximadamente 100-250 µg/kg. Alternativamente, un ejemplo de régimen posológico comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 5-100 µg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 5-250 µg/kg del anticuerpo anti-FcεRI, o seguida de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 5-250 µg/kg en semanas alternas. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes posológicos, dependiendo de los parámetros farmacocinéticos que el profesional desee lograr. Por ejemplo, se contempla la

dosificación de una a cuatro veces por semana. En algunas realizaciones, la frecuencia de dosificación es una vez cada día, en días alternos, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días; una vez por semana, cada 2 semanas, cada 4 semanas, cada 5 semanas, cada 6 semanas, cada 7 semanas, cada 8 semanas, cada 9 semanas o cada 10 semanas; o una vez al mes, cada 2 meses, o cada 3 meses, o más. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

El régimen posológico también puede variar con el tiempo. Un riesgo de la terapia anti-FcεRI es la inducción de la anafilaxis, como resultado de la activación crónica de los mastocitos y los basófilos. Para reducir este riesgo, es posible iniciar el tratamiento con dosis más pequeñas de anticuerpos anti-FcεRI seguido de un aumento gradual en la dosis de tratamiento. Dicho enfoque sería similar a la inmunoterapia con alérgenos, donde la dosis de alérgeno aumenta gradualmente con el tiempo. La inmunoterapia con alérgenos induce la activación repetida de basófilos y mastocitos y se realiza de forma rutinaria en el ámbito ambulatorio para enfermedades tan benignas como la rinitis alérgica. Por lo tanto, en una realización, la terapia anti-FcεRI se puede administrar a una dosis inicial más pequeña seguida de dosis que aumentan gradualmente. El régimen posológico particular, es decir, la dosis, el tiempo y la repetición, dependerá del individuo en particular y del historial médico de ese individuo, así como de las propiedades del anticuerpo anti-FcεRI (como la vida media del anticuerpo y otras consideraciones conocidas en la técnica).

La toxicidad y la eficacia terapéutica de la composición pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la LD₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Los anticuerpos que muestran índices terapéuticos grandes pueden ser menos tóxicos y/o más terapéuticamente eficaces.

Ejemplos

Para probar si la activación crónica de basófilos y mastocitos puede proteger contra una enfermedad autoinmunitaria controlada por Th1, se estudiaron los efectos de las inyecciones repetidas de anticuerpos anti-FcεRI en el desarrollo de la diabetes tipo 1 en el modelo de ratón NOD. Los estudios demuestran que la terapia anti-FcεRI activa los basófilos y los mastocitos, induce la liberación de IL-4 e histamina *in vivo*, y retrasa el inicio de la diabetes tipo 1 y mejora la supervivencia en el ratón NOD. Los estudios que utilizan ratones NOD deficientes en IL-4 y el bloqueo terapéutico de histamina revelan que la IL-4, pero no la señalización de histamina a través de los receptores H1 o H2, desempeña un papel parcial en los efectos protectores de la terapia anti-FcεRI.

Material y Métodos

Ratones: Ratones NOD hembra y NOD^{129P2}(B6)-*IL4^{tm1Cgn}*/DvsJ deficientes en IL-4 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) se mantuvieron en las instalaciones para animales de la Uniformed Services University (USU) con acceso libre a alimentos y agua. Todos los experimentos se realizaron bajo protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la USU.

Evaluación de la diabetes: Los niveles de glucosa de los ratones se determinaron a partir de la sangre extraída mediante sangrados orbitales cada dos semanas utilizando un medidor de glucosa en sangre estándar (Accu-Check® Advantage, Roche Diagnostics GmbH). Los ratones con niveles de glucosa superiores a 230 mg/dl en dos mediciones consecutivas se consideraron diabéticos.

Tratamiento con anticuerpos anti-FcεRI: A partir de las 6 semanas de edad, los ratones recibieron semanalmente inyecciones i.p. a lo largo del experimento, se inyectaron 50 µg de anti-FcεRI de ratón de hámster armenio (MAR-I, eBioscience, San Diego, CA) o IgG control de hámster armenio (control de isotipo, grado funcional purificado, eBioscience, San Diego, CA). Los subgrupos de animales se sacrificaron a las 16 semanas de edad, un día después de la última inyección de anti-FcεRI o IgG, para evaluar la inflamación del páncreas, la producción de citosinas por los ganglios linfáticos esplénicos y pancreáticos, los subtipos celulares y los niveles de IgG1 e IgG2c específicos de la insulina. Se probaron diferentes regímenes de tratamiento anti-FcεRI más cortos a partir de las 6 semanas de edad. Esos regímenes incluyeron semanalmente inyecciones i.p. de 50 µg de anti-FcεRI o IgG de control durante cuatro semanas e inyecciones i.p. de 25 y 50 µg y anti-FcεRI o control de IgG dos veces por semana durante cuatro semanas. En un experimento separado, a partir de las 12 semanas de edad, los ratones recibieron inyecciones i.p. de 5 µg de anti-FcεRI de ratón de hámster armenio (MAR-I, eBioscience, San Diego, CA) o control de IgG de hámster armenio (control de isotipo, grado funcional purificado, eBioscience, San Diego, CA) diariamente durante 10 días consecutivos.

Evaluación de la inflamación del páncreas: A las 16 semanas de edad, los páncreas se aislaron y se fijaron en formalina al 10 %. Un patólogo cegado al grupo de intervención evaluó la inflamación de los cortes teñidos con eosina con hematoxilina. Se evaluaron los números totales de islotes de tres cortes longitudinales separados 400 µm de cada páncreas. La gravedad de la insulinitis se calificó como no infiltrada, periinsulitis (linfocitos en la periferia de los islotes) o intransulitis (infiltración de linfocitos en el interior de los islotes menor o mayor que 50 %).

Cultivo de células de ganglio linfático de bazo y páncreas: A las 16 semanas de edad, los animales que se trataron durante 10 semanas con anti-FcεRI o IgG de control, se sacrificaron y se aislaron el bazo y los ganglios linfáticos pancreáticos. Las células de los ganglios linfáticos del bazo y del páncreas se prepararon y cultivaron como se ha descrito anteriormente (8). En resumen, se obtuvieron suspensiones de células individuales, se realizó una lisis de eritrocitos para las células del bazo (ACK Lysing Buffer, Quality Biological, Inc., Gaithersburg, MD) y las células se sembraron a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio enriquecido (medio Dulbecco modificado por Iscove (Mediatech, Manassas, VA) que incluye 10 % de suero de ternera fetal (Valley Biomedical, Winchester, VA), L-glutamina 1 % (Mediatech, Gaithersburg, MD), insulina-medio de transferrina-selenio 1 % (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) y 80 µg/ml de gentamicina (Quality Biological, Inc., Gaithersburg, MD)), estimulados con 5 µg/ml de anti-CD3 y 2 µg/ml de anti-CD28 (eBioscience, San Diego, CA), y se cultivó a 37 °C, CO₂ 5 %.

Análisis por citometría de flujo de linfocitos T reguladores y producción de citocinas intracelulares por linfocitos T: Las células del bazo y de los ganglios linfáticos pancreáticos se cultivaron como se describió anteriormente y se prepararon para el análisis de flujo como se informó anteriormente (8). En resumen, después de dos horas de incubación, se añadió BD GolgiStop™ (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) y las células se incubaron durante cuatro horas adicionales. Las células recolectadas se fijaron y se permeabilizaron (eBioscience, San Diego, CA) durante la noche. Para el análisis, las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS)/BSA 1 % (albúmina de suero bovino, Sigma, St. Louis, MO), seguido de una etapa de bloqueo con PBS/BSA 1 %. Las células se lavaron con tampón de permeabilización 1x (eBioscience, San Diego, CA) y se tiñeron para un flujo de cinco o cuatro colores usando CD4 PerCP, IL-4 APC (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ), CD8a Pacific Blue, interferón gamma (IFN-γ) FITC, e IL-17 PE (eBioscience, San Diego, CA) o CD4 PerCP (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ), FoxP3 FITC, CD25 APC-Alexa Fluor 750 e IL-10 PE (eBioscience, San Diego, CA). Para la identificación de linfocitos T CD8 reguladores y los linfocitos B reguladores, las células de bazo fijadas, crioconservadas (PBS/DMSO 10 %) se lavaron una vez, se bloquearon con CD16/CD32 (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) y se tiñeron con CD4 Qdot 605 (Invitrogen, Carlsbad, CA), CD8 PE Cy5, FoxP3 FITC, (eBioscience, San Diego, CA) o B220 PerCP, CD1d FITC, CD5 APC (todos de BD Bioscience), e IL-10 PE (eBioscience, San Diego, CA). La citometría de flujo se realizó utilizando un sistema BD LSRII y posteriormente se analizó con el software FACSDiVa 6.1 (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ).

Medición de citocinas y anticuerpos por ELISA: Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) de citocinas se realizaron a partir de cultivos de células de ganglios linfáticos de bazo y páncreas. Los sobrenadantes de cultivo de células que se cultivaron como se describe anteriormente y estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 se recogieron después de 72 h de incubación. IFN-γ, IL-4, IL-5 e IL-10 se cuantificaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ).

Las IgG1 e IgG2c específicas de insulina derivadas de plasma se analizaron mediante ELISA de sándwich como se describió anteriormente (8). Todas las muestras se analizaron como duplicados al mismo tiempo en la misma placa para permitir una comparación precisa entre grupos por OD.

Análisis de citometría de flujo de basófilos y mastocitos: La frecuencia de los basófilos en la sangre periférica y los mastocitos peritoneales se midió mediante citometría de flujo un día después de una inyección única de 50 µg de anti-FcεRI o IgG de control en ratones NOD hembras de 8 semanas de edad.

El flujo de basófilos se realizó como se describió anteriormente (16). En resumen, se diluyeron 100 µl de sangre obtenida por sangrado orbital con 100 µl de medio RPMI (RPMI-1640, Mediatech, Manassas, VA), se lisaron los glóbulos rojos y se fijaron las células (Whole Blood Lysing Reagent Kit, Beckman Coulter, Inc., Indianópolis, IN). Después de dos etapas de lavado con 1x PBS, las células se bloquearon durante la noche con PBS/BSA 1 %. Las células se lavaron y se tiñeron con IgE FITC (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ), CD4 PerCP (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) y B220 PerCP (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ). Durante el análisis de citometría de flujo, los basófilos se identificaron como células CD4-/B220-/IgE+.

Los mastocitos se obtuvieron mediante un lavado peritoneal con 1x HBSS (Gibco, Carlsbad, CA) y se fijaron después de la lisis de los glóbulos rojos (Whole Blood Lysing Reagent Kit, Beckman Coulter Inc., Indianópolis, IN). Las células se lavaron una vez y se bloquearon durante la noche en PBS/BSA 1 %. Se tiñeron 1×10^6 células peritoneales para determinar el flujo con IgE FITC (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) y cKit APC (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ). Durante el análisis de citometría de flujo, los mastocitos se identificaron como células IgE+/cKit+.

Detección de histamina a partir de mastocitos purificados estimulados *in vitro*: Para la activación de los mastocitos *in vitro*, los mastocitos peritoneales se purificaron usando un gradiente de percoll del 70 %. Se cultivaron 2000 mastocitos en 250 µl de tampón de liberación de histamina (Immunotech SAS, Marsella, Francia) y se estimularon con isotipo (10 µg/ml) o anti-FcεRI (0,4, 1,6, 6,25, 25, 100 µg/ml) durante 30 minutos. Las células se acilaron y el ELISA de histamina se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Immunotech S.A.S., Marsella, Francia).

Detección de IL-4 intracelular de basófilos estimulados *in vitro*: Para la detección de basófilos por IL-4 intracelular, se cultivaron 100 µl de sangre periférica de ratones NOD con GolgiStop (BD Bioscience, Franklin Lake,

NJ) y cualquiera de los medios, control de isotipo 10 µg/ml, 10 o 25 µg/ml de anti-FcεRI (MAR-1) durante un total de 6 h a 37 °C. Después de la lisis de los glóbulos rojos y la fijación (realizada como se menciona anteriormente), las células se tiñeron en un procedimiento de dos pasos para el flujo. Las células se tiñeron para los marcadores de superficie IgE FITC, CD4 PerCP y B220, seguido de permeabilización (tampón de permeabilización, BD Bioscience, Franklin Lake, NJ) y se tiñeron con IL-4 APC (BD Bioscience, Franklin Lake NJ).

Como los basófilos son las únicas células circulantes en ratones que expresan FcεRI, la liberación de IL-4 de la sangre completa se midió después de la estimulación *in vitro* de 100 µl de sangre periférica de ratones NOD cultivados con 10 µg/ml de anticuerpo anti-FcεRI, control de isotipo 10 µg/ml de IgG, o medios durante 6 horas a 37 °C. El plasma se obtuvo por centrifugación y se almacenó a -20 °C hasta que se realizó el ELISA de IL-4 según las instrucciones del fabricante (eBioscience, San Diego, CA).

Ensayo de captura de citocinas *in vivo* para detectar la liberación de IL-4 después de la inyección de anti-FcεRI: Se inyectaron i.p. 10 µg de anticuerpo anti-IL-4 biotinilado (BD Bioscience, Franklin Lake, NJ) en ratones NOD de 11 semanas de edad. Al día siguiente se inyectaron i.p. ratones con 50 µg de anti-FcεRI o IgG de control y un día después, se recogió la sangre mediante sangrado orbital. La concentración de IL-4 se midió mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ).

Detección de la liberación de histamina *in vivo* después de la inyección de anti-FcεRI: Los ratones fueron inyectados i.p. con una dosis única de 50 µg de anti-FcεRI o IgG de control. Después de 30 minutos, la sangre se recogió por sangrado orbital. Se acilaron inmediatamente 100 µl de sangre y se realizó ELISA con histamina según las instrucciones del fabricante (Immunotech S.A.S., Marsella, Francia).

Tratamiento con bloqueadores de los receptores de histamina: A partir de las 6 semanas de edad, se añadieron al agua de bebida de los ratones NOD 2,5 mg/ml de cimetidina (Sigma, St. Louis, MO), un bloqueador del receptor de H₂, y 0,25 mg/ml de fexofenidina HCl (TEVA Pharmaceuticals, Washington, D.C.), un bloqueador del receptor de H₁. El agua potable tratada se preparó en el momento cada dos días a lo largo del experimento hasta las 25 semanas de edad.

La eficacia del bloqueo del receptor H₂ se probó midiendo el pH del estómago, 2 días después de cambiar el agua potable en ratones que habían estado recibiendo tratamientos con fexofenidina y cimetidina durante 2 semanas. Los ratones se sacrificaron y el pH del estómago se midió utilizando tiras de pH (Micro Essential Laboratory, Brooklyn, NY). Además, el bloqueo de los receptores de histamina se confirmó *in vivo* mediante la inyección de 10 µg de anti-FcεRI por vía intradérmica en una oreja y 10 µg de control de IgG en la otra, seguido de inyección i.v. de 200 µl de azul de toluidina (Sigma, St. Louis, MO, 0,5 % en PBS) 3 minutos más tarde. Las orejas se diseccionaron 10 minutos más tarde y la permeabilidad vascular se midió a 620 nm por la densidad óptica (OD) del colorante azul extraído de las orejas después de la incubación durante la noche a una temperatura de 63 °C en formamida (Sigma, St. Louis, MO).

Análisis estadístico: Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism (software GraphPad). Las diferencias entre grupos pareados para los estudios *in vitro* se analizaron utilizando la prueba T pareada de una cola y las diferencias entre dos grupos no pareados para los estudios *in vivo* se evaluaron para determinar la significancia con la prueba U de Mann-Whitney. Los valores de p < 0,05 se consideraron significativos. Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces.

Ejemplo 1: El anticuerpo anti-FcεRI activa basófilos y mastocitos de ratones NOD

Para evaluar los efectos del anticuerpo anti-FcεRI sobre los mastocitos *in vitro*, se evaluó la liberación de histamina de mastocitos purificados de la cavidad peritoneal de ratones NOD en respuesta a la incubación *in vitro* con diversas concentraciones de anti-FcεRI. La centrifugación en gradiente de densidad de las células peritoneales tuvo como resultado un alto nivel de enriquecimiento de mastocitos (> 70 % de pureza para todas las muestras, Fig. 1A). Si bien la incubación de mastocitos enriquecidos con medio o anticuerpo de isotipo no produjo una liberación de histamina demostrable antes de la incubación con medio solo, la incubación con concentraciones crecientes de anticuerpo anti-FcεRI tuvo como resultado una curva de activación de mastocitos clásica (Fig. 1B).

Para determinar si el anticuerpo anti-FcεRI también activa los basófilos *in vitro*, las muestras de sangre completa de ratones NOD se evaluaron para determinar la producción de IL-4 de basófilos mediante citometría de flujo intracelular. Los basófilos se identificaron mediante citometría de flujo como linfocitos CD4-B220-IgE+ (Fig. 1C), ya que esta estrategia de tinción ha demostrado ser específica para los basófilos (16). Mientras que un promedio del 18 % de los basófilos se tiñeron positivamente para la IL-4 al inicio del estudio, en promedio, el 65 % eran IL-4+ después de la incubación con anti-FcεRI (p < 0,0001, Fig. 1D). Para confirmar que el anti-FcεRI induce la liberación de IL-4 de los basófilos, se midió la IL-4 mediante ELISA en los sobrenadantes de muestras de sangre total incubadas con medios o anti-FcεRI. Como se ve en la Figura 1E, el anti-FcεRI causó una liberación significativa de IL-4 de la sangre total (concentración media no estimulada de IL-4 32 pg/ml frente a la media de 77 pg/ml después de la estimulación con anti-FcεRI, p = 0,03). Como los basófilos son las únicas células circulantes en ratones que expresan anti-FcεRI, este ensayo confirma que el anticuerpo anti-FcεRI induce la liberación de IL-4 de los basófilos.

Ejemplo 2: Las inyecciones de anti-FcεRI agotan los basófilos e inducen la liberación masiva de histamina e IL-4 *in vivo*

Como tanto los basófilos como los mastocitos expresan el FcεRI en su superficie, probamos si el tratamiento con anticuerpo anti-FcεRI agota los basófilos periféricos o los mastocitos peritoneales inyectando a los ratones NOD 50 µg de anti-FcεRI y midiendo las frecuencias de basófilos en la sangre y de los mastocitos peritoneales por citometría de flujo. Los basófilos se identificaron como células CD4-B220-IgE+ y los mastocitos peritoneales se identificaron como células cKit positivo, IgE positivo. La frecuencia de las células sanguíneas que eran basófilos se redujo significativamente un día después del tratamiento con anticuerpo anti-FcεRI en comparación con los animales de control (mediana 0,11 %, rango 0,05-0,19 % frente a 0,40 %, 0,19-0,63 %; Fig. 2A), mientras que la frecuencia de los mastocitos peritoneales no se modificó (mediana 1,8 %, rango 0,2-2,5 % frente a 2,1 %, 0,1-3,2 %, Fig. 2B). Este hallazgo es consistente con el de otros grupos de investigación que han usado anticuerpos anti-FcεRI para agotar a ratones de basófilos (21, 27).

Debido a que la agregación de la superficie de FcεRI activa basófilos y mastocitos, y dado que nuestros estudios *in vitro* demostraron que el anticuerpo anti-FcεRI induce a los basófilos y mastocitos a liberar IL-4 e histamina, probamos si la inyección de anticuerpo anti-FcεRI aumenta los niveles de IL-4 e histamina en la sangre. Como se ve en la Figura 2C, los ratones a los que se inyectó anti-FcεRI el día anterior tenían frecuencias significativamente más altas de IL-4 circulante, según lo medido mediante el ensayo de captura de citocinas *in vivo*, en comparación con los controles tratados con el isotipo del anticuerpo ($p = 0,0015$, mediana 863 pg/ml, rango 0-1173 pg/ml frente a 10 pg/ml, rango 0-34 pg/ml). De manera similar, la histamina, que se midió en sangre periférica obtenida 30 minutos después de la inyección del anticuerpo debido a su semivida tan corta, fue sustancialmente mayor en los ratones tratados con anti-FcεRI que en los controles. Los ratones que recibieron anti-FcεRI tenían una concentración media de histamina en sangre de 28.800 nmol (rango 7.745-137.700 nmol) en comparación con solo 248 pg/ml (rango 81-441 pg/ml, $p < 0,0001$, Fig. 2D). Como los basófilos y los mastocitos son las únicas células que contienen histamina preformada, estos resultados demuestran que la inyección de anticuerpos anti-FcεRI activa los basófilos y los mastocitos *in vivo*.

Ejemplo 3: El tratamiento con anti-FcεRI retrasa la aparición de diabetes en ratones NOD

Para probar la hipótesis de que la activación crónica de basófilos y mastocitos protege contra enfermedades autoinmunitarias, se controló el desarrollo de diabetes tipo I en ratones NOD a los que se administraron inyecciones repetidas de anticuerpos anti-FcεRI.

Las inyecciones continuas con anti-FcεRI redujeron significativamente las concentraciones de glucosa en sangre en ratones NOD a las 20 y 24 a 28 semanas de edad en comparación con los animales de control (Fig. 3A) y retrasaron el inicio de la diabetes (aparición de diabetes en el 50 % de los animales: grupo IgG: 20 semanas de edad, anti-FcεRI: 30 semanas de edad, Fig. 3B). El análisis histológico del páncreas reveló que los ratones tratados con anti-FcεRI tenían un mayor número total de células β de los islotes y menos infiltración de linfocitos de los islotes pancreáticos en comparación con los ratones tratados con IgG a las 16 semanas de edad, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 3C).

Los períodos más cortos de tratamiento con anticuerpos anti-FcεRI de 6 a 9 semanas de edad no proporcionaron un efecto protector similar. Ni 4 inyecciones semanales con 50 µg de anti-FcεRI, ni 4 semanas de inyecciones con 25 o 50 µg dos veces a la semana disminuyeron los niveles de glucosa en sangre o la frecuencia de ratones NOD diabéticos en comparación con los controles tratados con isotipo de anticuerpos (Figs. 3D y 3E).

Ejemplo 4: El tratamiento con anti-FcεRI induce un cambio Th2 en el anticuerpo, pero no la producción de citocinas

El efecto del tratamiento anti-FcεRI de 10 semanas sobre la producción de citocinas celulares se evaluó a partir de las células de los ganglios linfáticos de bazo y pancreáticos de ratones NOD de 16 semanas de edad después de la estimulación con anti-CD3/anti-CD28. Los niveles de IFNγ e IL-4 fueron similares entre los controles inyectados con anticuerpos de isotipo y los animales tratados con anti-FcεRI (Figs. 4A y 4B), mientras que la concentración de IL-5 aumentó significativamente en los ratones tratados con anti-FcεRI (Fig. 4C). Las células de los ganglios linfáticos pancreáticos de ratones inyectados con anti-FcεRI produjeron más IL-5 e IFNγ en respuesta a anti-CD3/anti-CD28 en comparación con los controles, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística (Figs. 4D y 4E).

Las frecuencias de linfocitos T CD4+IFNγ+ esplénicos y linfocitos T CD8+IFNγ+ (Figs. 4F y 4G), así como de linfocitos T CD4+IL-4+ (Fig. 4H) después de la estimulación *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28 no se vieron afectadas significativamente por el tratamiento anti-FcεRI. Las frecuencias de linfocitos T CD4+IL-17+ esplénicos estimulados con anti-CD3/anti-CD28 aumentaron en los animales tratados con anti-FcεRI en comparación con los controles, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística ($p = 0,079$, Fig. 4I).

Como las respuestas inmunitarias celulares específicas de antígeno son difíciles de detectar en ratones NOD, probamos si las inyecciones repetidas de anticuerpos anti-FcεRI inducen los subgrupos de anticuerpos asociados a

Th1 (IgG2c) o Th2 (IgG1) específicos de insulina. Los ratones que fueron tratados durante 10 semanas con anticuerpos anti-Fc ϵ RI tuvieron niveles significativamente mayores de IgG1 específica de insulina en comparación con los controles inyectados con isotipo de anticuerpos, mientras que los niveles de IgG2c específica de insulina no se modificaron (Figs. 4J y 4K).

Ejemplo 5: El tratamiento con anti-Fc ϵ RI induce un aumento marginal en las respuestas reguladoras

Las frecuencias de los linfocitos T reguladores y la producción de la citocina inmunorreguladora IL-10 se midieron a partir de células de ganglios linfáticos del bazo y pancreáticos en respuesta a anti-CD3/anti-CD28 después de 10 semanas de tratamiento con anticuerpos anti-Fc ϵ RI para evaluar el desarrollo de una respuesta inmunitaria reguladora.

Si bien el tratamiento repetido con anti-Fc ϵ RI no alteró sustancialmente el porcentaje de linfocitos T CD4+ que fueron CD25+FoxP3+ en el bazo (media 12,5 % en ratones tratados con isotipo frente al 13,3 % tratados con anti-IgE), los porcentajes medios de linfocitos T reguladores CD4+CD25+FoxP3+ en los ganglios linfáticos pancreáticos aumentaron sustancialmente (3 % en el tratamiento con isotipo frente al 5,2 % en tratados con anti-Fc ϵ RI, Fig. 5B) aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística ($p = 0,17$). De manera similar, los porcentajes de células del bazo CD8+ que fueron positivas para FoxP3+ (Fig. 5C), de linfocitos B esplénicos que produjeron IL-10 (Fig. 5D) y de linfocitos B esplénicos que expresaron un fenotipo regulador (B220+CD1d+CD5+, Fig. 5E) aumentaron todos después del tratamiento con anti-Fc ϵ RI, aunque ninguno alcanzó la significación estadística. Las inyecciones repetidas de anticuerpos anti-Fc ϵ RI también aumentaron ligeramente la producción de IL-10 de ganglios linfáticos esplénicos ($p = 0,18$, Fig. 5F) y pancreáticos ($p = 0,44$, Fig. 5G) en respuesta a anti-CD3/anti-CD28, aunque de nuevo los aumentos no fueron estadísticamente significativos.

Ejemplo 6: La señalización de histamina a través de los receptores H1 y H2 no es necesaria para el retraso inducido por anti-Fc ϵ RI de la diabetes tipo I

Como la inyección con anti-Fc ϵ RI dio como resultado la liberación de cantidades incrementadas de histamina y como la histamina puede tener propiedades inmunomoduladoras, probamos si el bloqueo de los receptores de histamina H1 y H2 evitaría el retraso mediado por anti-Fc ϵ RI en la aparición de diabetes en ratones NOD.

La cimetidina (un bloqueador del receptor de H2) y la fexofenadina (un bloqueador del receptor H1) se administraron mediante la adición al agua de bebida de ratones NOD de 6 semanas de edad para estudiar el criterio de valoración a las 25 semanas de edad a las concentraciones utilizadas por investigadores anteriores (28, 29).

La eficacia del bloqueo del receptor H₂ se confirmó por un aumento significativo en el pH del estómago de los animales tratados en comparación con los controles (Fig. 6A). El bloqueo de los receptores H₁ se confirmó mediante la evaluación de los cambios en la fuga vascular en respuesta a la inyección intradérmica de anti-Fc ϵ RI. Para mejorar la visualización de la fuga vascular en el oído, los ratones NOD recibieron inyecciones intravenosas de azul de toluidina. Los ratones NOD de control mostraron una fuga vascular local sustancial en respuesta a la inyección intradérmica con anticuerpo anti-Fc ϵ RI mientras que los ratones tratados con fexofenadina no lo hicieron (Fig. 6B, orejas izquierdas). La fuga vascular fue una respuesta específica al anticuerpo anti-Fc ϵ RI, ya que la inyección intradérmica del anticuerpo de control no indujo la fuga vascular (Fig. 6B, orejas derechas).

Como se ve en las figuras 6C y 6D, el bloqueo continuo del receptor de histamina no anuló el efecto protector del tratamiento con anticuerpos anti-Fc ϵ RI en el desarrollo de la diabetes en ratones NOD. El tratamiento con anticuerpos anti-Fc ϵ RI durante el bloqueo del receptor de histamina produjo una reducción significativa de los niveles de glucosa en sangre a las 17-21 semanas de edad (Fig. 6C) y retrasó la aparición de la diabetes en comparación con los animales de control (aparición de la diabetes en el 50 % de los animales: grupo del isotipo de IgG: 17 semanas de edad, grupo de anticuerpos anti-Fc ϵ RI: 23 semanas de edad, Fig. 6D).

Ejemplo 7: La eficacia de la protección mediada por anticuerpos anti-Fc ϵ RI se reduce en ausencia de IL-4

Dado que la inyección de anticuerpos anti-Fc ϵ RI *in vivo* aumentó los niveles de IL-4 y dado que IL-4 puede contrarrestar las respuestas autoinmunitarias de Th1 patógenas, probamos si el efecto protector del anticuerpo anti-Fc ϵ RI era dependiente de IL-4 tratando ratones NOD deficientes en IL-4 con inyecciones semanales repetidas de anti-Fc ϵ RI.

Se administraron inyecciones semanales de anti-Fc ϵ RI o control de IgG de 6 a 20 semanas de edad. Aunque los niveles de glucosa en la sangre se redujeron en los animales con deficiencia de IL-4 tratados con anti-Fc ϵ RI (Fig. 7A), la diferencia en comparación con los animales tratados con IgG fue menos prominente que la observada previamente en ratones NOD inmunocompetentes (Fig. 3A) y no alcanzó la significancia estadística. De manera similar, la protección contra la diabetes patente, aunque todavía está presente (aparición de diabetes en el 50 % de los animales: grupo de anticuerpos con isotipo: 24 semanas de edad, grupo de anticuerpos anti-Fc ϵ RI: 26 semanas de edad, Fig. 7B), fue sustancialmente menor que la que se había observado en ratones inmunocompetentes (Fig. 3B).

Ejemplo 8: El aumento de la frecuencia de administración de anti-FcεRI en ratones NOD aumenta la eficacia

En un esfuerzo por mejorar la eficacia del tratamiento con anticuerpos anti-FcεRI en el modelo de ratón NOD, probamos un régimen más intensivo y de carga frontal de terapia con anti-FcεRI administrada a ratones NOD más viejos. A los ratones se les administraron 5 µg de anticuerpo anti-FcεRI diariamente durante 10 días consecutivos. En lugar de iniciar la terapia con anti-FcεRI a las 6 semanas, como en los estudios anteriores, el anticuerpo anti-FcεRI no se inició hasta las 12 semanas de edad. Como se ve en la figura 8, la administración de 5 µg de anticuerpo anti-FcεRI diariamente durante 10 días consecutivos dio como resultado una protección casi completa contra la diabetes tipo 1 en ratones NOD de hasta 28 semanas de edad. Además, esta protección observada en ratones NOD es particularmente impresionante dado que las inyecciones de anti-FcεRI no se iniciaron hasta las 12 semanas de edad, un momento en el que los ratones NOD tenían generalmente inflamación continua en sus islotes pancreáticos. Por lo tanto, este régimen más intensivo parece más efectivo que la estrategia de dosificación previa (10 inyecciones semanales de 50 µg de anticuerpo anti-FcεRI) y demuestra que la terapia anti-FcεRI puede usarse para tratar la enfermedad autoinmunitaria activa.

Discusión: Este estudio demuestra que se puede usar la terapia anti-FcεRI repetida para tratar la diabetes tipo 1 en un modelo de ratón reconocido en la técnica. La administración continua de anticuerpos anti-FcεRI redujo la incidencia de diabetes en ratones NOD en aproximadamente un 50 % en comparación con los controles y se asoció con un aumento en el número total de células β de los islotes pancreáticos. El aumento de la frecuencia de la administración de anticuerpos anti-FcεRI mejora la eficacia del tratamiento y aumenta dramáticamente la tasa de supervivencia de los ratones NOD con enfermedad activa. Los efectos protectores fueron más pronunciados después del tratamiento crónico con anticuerpos anti-FcεRI, mientras que los regímenes de tratamiento más cortos durante 4 semanas no dieron como resultado una protección apreciable de la enfermedad.

Los ensayos *in vitro* e *in vivo* mostraron que el anticuerpo anti-FcεRI activa basófilos y mastocitos y aumenta considerablemente los niveles circulantes de histamina e IL-4. Sospechamos que la mayor parte de la liberación de IL-4 se debió a la activación de basófilos, ya que los basófilos son las únicas células que se sabe que almacenan grandes cantidades de IL-4 preformada (30), son los principales contribuyentes de IL-4 en las infecciones por helmintos y en las enfermedades alérgicas (17, 19, 31), y se ha demostrado que liberan más IL-4 por célula que otros tipos de células (32, 33). Por lo que sabemos, esta es la primera demostración de que la activación crónica de basófilos y mastocitos está asociada con la protección contra la autoinmunidad.

Aunque el tratamiento continuo con anticuerpos anti-FcεRI no dio lugar a un claro cambio de Th2 en la producción de citocinas, medido a partir de células de ganglios linfáticos del bazo y del páncreas, los aumentos en la IgG1 específica de insulina revelaron un cambio inmunitario de tipo 2 (Th2) en la producción de anticuerpos. El aumento de los niveles séricos de IL-4 después del tratamiento con anticuerpos anti-FcεRI sugiere que este cambio inmunitario de tipo 2 en las respuestas de anticuerpos puede haber sido determinado por la IL-4 liberada de células innatas activadas por anticuerpos en lugar de linfocitos T. Este cambio inmunitario de tipo 2 en los isotipos de anticuerpos específicos de la insulina es similar al observado cuando los ratones NOD se infectan con el nematodo filarial *Litomosoides sigmodontis* (8), una intervención que también da como resultado la protección contra la diabetes.

Si bien la señalización de la histamina a través de los receptores H1 y H2 no parece necesaria para la protección, ya que el tratamiento con bloqueadores de los receptores H1 y H2 no atenuó los efectos protectores de las inyecciones de anti-FcεRI, los resultados obtenidos con ratones NOD deficientes en IL-4 demuestran que IL-4 es en parte responsable del beneficio terapéutico. El hallazgo de que la IL-4 protege contra la enfermedad autoinmunitaria concuerda con los estudios anteriores. En ratones NOD, se ha demostrado que la administración sistémica de IL-4 (34, 35), la expresión de IL-4 por las células de los islotes β pancreáticos (36) y la transferencia de DC que expresan IL-4 (37, 38) previenen el inicio de la diabetes autoinmunitaria. Los estudios que utilizan helmintos para prevenir la autoinmunidad sugieren un papel importante para la IL-4 en el control de las enfermedades autoinmunitarias mediadas por Th1. La protección inducida por helmintos o antígenos de helmintos contra la diabetes autoinmunitaria está asociada con la inducción de respuestas inmunitarias Th2 (8) y los estudios en colitis inducida por encefalitis autoinmunitaria experimental y ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) mostraron que la administración de huevos de *Schistosoma* no protegió contra la autoinmunidad en ratones deficientes en STAT6 o agotados de IL-4 (39). Además de contrarrestar las respuestas inmunitarias de Th1, la IL-4 inducida por FcεRI puede proteger contra las respuestas autoinmunitarias dirigidas por Th1 al determinar la diferenciación de macrófagos clásicos (asociados a Th1) en un fenotipo activado alternativo (AAMØ). Los AAMØ son antiinflamatorios y se sabe que son más frecuentes durante las infecciones por helmintos (40).

En este estudio, se utilizaron anticuerpos anti-FcεRI para inducir la liberación de IL-4 mediante la activación sistémica de basófilos y mastocitos. Un enfoque que se basa en inyecciones de anticuerpos para desencadenar la liberación de IL-4 podría ser más fácil de transferir a la cabecera en comparación con las terapias que consisten en la inyección de citocinas.

Además, dado que los efectos protectores de la terapia anti-FcεRI solo se redujeron parcialmente en los ratones NOD deficientes en IL-4, es probable que los mecanismos independientes de IL-4 también puedan desempeñar un

papel en la terapia con anti-FcεRI. Estos mecanismos independientes de IL-4 pueden estar directamente relacionados con la activación de basófilos y/o mastocitos, o pueden deberse a la inducción de vías de retroalimentación negativa inducidas por la activación crónica de estas células.

Un mecanismo independiente de IL-4 puede ser la inducción de la liberación de IL-13 mediante inyecciones de anti-FcεRI, ya que se ha demostrado que IL-13 previene la aparición de diabetes en ratones NOD (41). Tanto los basófilos como los mastocitos pueden producir IL-13 después de la reticulación de FcεRI. Debido a que IL-13 señala a través de IL-4Rα, es posible que la IL-13 inducida por anti-FcεRI asumiera algunas de las funciones de IL-4 en ratones NOD deficientes en IL-4 y contribuyera a la protección mediada por anti-FcεRI. La evaluación de si IL-13 juega un papel en la protección mediada por anti-FcεRI contra la autoinmunidad será el tema de futuros estudios. Por el contrario, el aumento no significativo observado de linfocitos Th17 durante la terapia anti-FcεRI es muy poco probable que sea un mecanismo por el cual las inyecciones anti-FcεRI protegen contra la diabetes tipo 1 porque se piensa que las respuestas Th17 juegan un papel en la inducción de la diabetes tipo 1, posiblemente por conversión de Th17 en linfocitos Th1 que pueden causar el inicio de la diabetes (42-45).

Otro mecanismo independiente de IL-4 que puede ser importante es la inducción de redes inmunorreguladoras. Al activar repetidamente los basófilos y los mastocitos, replicamos el fenotipo inmunológico observado en las infecciones crónicas por helmintos y en la inmunoterapia con alérgenos. En las infecciones por helmintos, los basófilos y los mastocitos se activan continuamente por antígenos parásitos a través de IgE específica del parásito en la superficie de estas células (18). En la inmunoterapia, a los pacientes con IgE específica para alérgenos se les administran repetidamente inyecciones de alérgenos para los que tienen IgE específica, lo que esencialmente induce un estado crónico de bajo nivel de basófilos y activación de mastocitos. Si bien los mecanismos por los cuales las infecciones crónicas por helmintos y la inmunoterapia con alérgenos modulan el sistema inmunitario no se conocen completamente, varios estudios muestran que ambos aumentan los reguladores clave de la tolerancia periférica, como los linfocitos reguladores de IL-10 y T. De hecho, las infecciones por helmintos que protegen contra enfermedades autoinmunitarias en modelos animales se han asociado repetidamente con aumentos de IL-10 y linfocitos T reguladores (8, 47, 48).

En nuestro estudio, aunque no es estadísticamente significativo, los niveles de producción de IL-10 a partir de esplenocitos, las frecuencias de linfocitos B productores de IL-10 y las frecuencias de linfocitos B CD1d+CD5+ reguladores fueron mayores en ratones que recibieron inyecciones de anticuerpos anti-FcεRI. Como una de las características distintivas de las enfermedades autoinmunitarias es la pérdida de tolerancia periférica (49), será importante para futuros estudios evaluar más exhaustivamente si la terapia anti-FcεRI funciona aumentando la tolerancia periférica. Del mismo modo, sería interesante evaluar si la inmunoterapia con alérgenos en pacientes alérgicos ha tenido efectos beneficiosos en pacientes con enfermedades autoinmunitarias concurrentes.

Los resultados de este estudio sugieren que la activación crónica de basófilos y mastocitos puede ser una terapia segura y factible, especialmente si el tratamiento se inicia con pequeñas cantidades de anticuerpos anti-FcεRI u otro agente activador de basófilos/mastocitos, seguido de un aumento gradual de las dosis de tratamiento. Dicho enfoque sería similar a la inmunoterapia con alérgenos, en la que la dosis de alérgeno administrada aumenta gradualmente con el tiempo. La inmunoterapia con alérgenos induce la activación repetida de basófilos y mastocitos y se realiza de forma rutinaria en el ámbito ambulatorio para enfermedades tan benignas como la rinitis alérgica.

Es importante destacar que, a diferencia de las terapias convencionales para enfermedades autoinmunitarias que predominantemente funcionan al incapacitar brazos específicos del sistema inmunitario, un enfoque terapéutico basado en la inducción crónica de basófilos y la activación de mastocitos tiene el potencial de inducir un efecto terapéutico sin inhibir irreversiblemente ninguna vía del sistema inmunitario.

En conclusión, este estudio demuestra que la administración repetida de anticuerpos anti-FcεRI da como resultado la activación de basófilos y mastocitos y la protección contra la diabetes tipo 1 en ratones NOD por un mecanismo que depende parcialmente de la IL-4. Dada la viabilidad de desarrollar anticuerpos para uso en humanos, los resultados de este estudio sugieren que los anticuerpos anti-FcεRI pueden usarse para tratar enfermedades autoinmunitarias mediadas por Th1, que incluyen, entre otras, diabetes mellitus insulino dependiente tipo 1, escleroderma, esclerosis múltiple, uveítis posterior, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Referencias

- [1] E.I. Benchimol, K.J. Fortinsky, P. Gozdyra, M. Van den Heuvel, J. Van Limbergen, and A.M. Griffiths, Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: A systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis* (2010).

- [2] E.A. Gale, The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 51 (2002) 3353-61.
- [3] E. Koutsouraki, V. Costa, and S. Baloyannis, Epidemiology of multiple sclerosis in Europe: a review. *Int Rev Psychiatry* 22 (2010) 2-13.
- [4] E.V. Loftus, Jr., Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126 (2004) 1504-17.
- [5] I. Logan, and C.L. Bowlus, The geoepidemiology of autoimmune intestinal diseases. *Autoimmun Rev* 9 (2010) A372-8.
- [6] P. Onkamo, S. Vaananen, M. Karvonen, and J. Tuomilehto, Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia* 42 (1999) 1395-403.
- [7] D.E. Elliott, R.W. Summers, and J.V. Weinstock, Helminths as governors of immune-mediated inflammation. *Int J Parasitol* 37 (2007) 457-64.
- [8] M.P. Hübner, J.T. Stocker, and E. Mitre, Inhibition of type 1 diabetes in filaria-infected non-obese diabetic mice is associated with a T helper type 2 shift and induction of FoxP3+ regulatory T cells. *Immunology* 127 (2009) 512-22.
- [9] P. Zaccane, O.T. Burton, and A. Cooke, Interplay of parasite-driven immune responses and autoimmunity. *Trends Parasitol* 24 (2008) 35-42.
- [10] A. Lehuen, J. Diana, P. Zaccane, and A. Cooke, Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol* 10 (2010) 501-13.
- [11] R.W. Summers, D.E. Elliott, J.F. Urban, Jr., R. Thompson, and J.V. Weinstock, *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut* 54 (2005) 87-90.
- [12] M.J. Allison, A. Pezzia, I. Hasegawa, and E. Gerszten, A case of hookworm infestation in a Precolumbian American. *Am J Phys Anthropol* 41 (1974) 103-6.
- [13] H. Aspöck, H. Auer, and O. Picher, *Trichuris trichiura* eggs in the neolithic glacier mummy from the Alps. *Parasitology Today* 12 (1996) 255-256.
- [14] J.A. Jackson, I.M. Friberg, S. Little, and J.E. Bradley, Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology* 126 (2009) 18-27.
- [15] J.V. Weinstock, R.W. Summers, D.E. Elliott, K. Qadir, J.F. Urban, Jr., and R. Thompson, The possible link between de-worming and the emergence of immunological disease. *J Lab Clin Med* 139 (2002) 334-8.
- [16] M.N. Torrero, D. Larson, M.P. Hübner, and E. Mitre, CD200R surface expression as a marker of murine basophil activation. *Clin Exp Allergy* 39 (2009) 361-9.
- [17] E. Mitre, R.T. Taylor, J. Kubofcik, and T.B. Nutman, Parasite antigen-driven basophils are a major source of IL-4 in human filarial infections. *J Immunol* 172 (2004) 2439-45.
- [18] M.N. Torrero, M.P. Hübner, D. Larson, H. Karasuyama, and E. Mitre, Basophils Amplify Type 2 Immune Responses, but Do Not Serve a Protective Role, during Chronic Infection of Mice with the Filarial Nematode *Litomosoides sigmodontis*. *J Immunol* 185 (2010) 7426-34.
- [19] B. Min, M. Prout, J. Hu-Li, J. Zhu, D. Jankovic, E.S. Morgan, J.F. Urban, Jr., A.M. Dvorak, F.D. Finkelman, G. LeGros, and W.E. Paul, Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J Exp Med* 200 (2004) 507-17.
- [20] C. Ohnmacht, and D. Voehringer, Basophil effector function and homeostasis during helminth infection. *Blood* 113 (2009) 2816-25.
- [21] J.G. Perrigoue, S.A. Saenz, M.C. Siracusa, E.J. Allenspach, B.C. Taylor, P.R. Giacomini, M.G. Nair, Y. Du, C. Zaph, N. van Rooijen, M.R. Comeau, E.J. Pearce, T.M. Laufer, and D. Artis, MHC class II-dependent basophil-CD4(+) T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol* (2009).
- [22] A. Finnegan, K. Mikecz, P. Tao, and T.T. Glant, Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines. *J Immunol* 163 (1999) 5383-90.
- [23] M.K. Shaw, J.B. Lorens, A. Dhawan, R. DalCanto, H.Y. Tse, A.B. Tran, C. Bonpane, S.L. Eswaran, S. Brocke, N. Sarvetnick, L. Steinman, G.P. Nolan, and C.G. Fathman, Local delivery of interleukin 4 by retrovirus-transduced T lymphocytes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 185 (1997) 1711-4.
- [24] A. Mazzoni, H.A. Young, J.H. Spitzer, A. Visintin, and D.M. Segal, Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest* 108 (2001) 1865-73.
- [25] C.A. Akdis, and M. Akdis, Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 123 (2009) 735-46; quiz 747-8.
- [26] C. Uermsi, R.R. Beerli, M. Bauer, V. Manolova, K. Dietmeier, R.B. Buser, T.M. Kundig, P. Saudan, and M.F. Bachmann, Mechanisms of allergen-specific desensitization. *J Allergy Clin Immunol* 126 (2010) 375-83.
- [27] C.L. Sokol, G.M. Barton, A.G. Farr, and R. Medzhitov, A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 9 (2008) 310-8.
- [28] P.M. Hewitt, N. Armstrong, P. Bowrey, M. Cherian, and D.L. Morris, Cimetidine prevents suppression of delayed hypersensitivity in an animal model of haemorrhagic shock. *Injury* 33 (2002) 673-8.
- [29] N. Watanabe, E. Matsuda, A. Masuda, K. Nariai, and T. Shibasaki, The effects of fexofenadine on eosinophilia and systemic anaphylaxis in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Int Immunopharmacol* 4 (2004) 367-75.
- [30] B.F. Gibbs, H. Haas, H.H. Wolff, and J. Grabbe, Early IgE-dependent release of IL-4 and IL-13 from leukocytes is restricted to basophils: a comparison with other granulocytes and mononuclear cells. *Inflamm Res* 49 Suppl 1 (2000) S9-10.

- [31] G. Devouassoux, B. Foster, L.M. Scott, D.D. Metcalfe, and C. Prussin, Frequency and characterization of antigen-specific IL-4- and IL-13- producing basophils and T cells in peripheral blood of healthy and asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 104 (1999) 811-9.
- [32] I. Aoki, C. Kinzer, A. Shirai, W.E. Paul, and D.M. Klinman, IgE receptor-positive non-B/non-T cells dominate the production of interleukin 4 and interleukin 6 in immunized mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 2534-8.
- [33] M. Poorafshar, H. Helmbj, M. Troye-Blomberg, and L. Hellman, MMCP-8, the first lineage-specific differentiation marker for mouse basophils. Elevated numbers of potent IL-4-producing and MMCP-8-positive cells in spleens of malaria-infected mice. *Eur J Immunol* 30 (2000) 2660-8.
- [34] M.J. Cameron, G.A. Arreaza, P. Zucker, S.W. Chensue, R.M. Strieter, S. Chakrabarti, and T.L. Delovitch, IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J Immunol* 159 (1997) 4686-92.
- [35] M.J. Rapoport, A. Jaramillo, D. Zipris, A.H. Lazarus, D.V. Serreze, E.H. Leiter, P. Cyopick, J.S. Danska, and T.L. Delovitch, Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 178 (1993) 87-99.
- [36] R. Mueller, T. Krah, and N. Sarvetnick, Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 184 (1996) 1093-9.
- [37] R.J. Creusot, S.S. Yaghoubi, K. Kodama, D.N. Dang, V.H. Dang, K. Breckpot, K. Thielemans, S.S. Gambhir, and C.G. Fathman, Tissue-targeted therapy of autoimmune diabetes using dendritic cells transduced to express IL-4 in NOD mice. *Clin Immunol* 127 (2008) 176-87.
- [38] M. Feili-Hariri, D.H. Falkner, A. Gambotto, G.D. Papworth, S.C. Watkins, P.D. Robbins, and P.A. Morel, Dendritic cells transduced to express interleukin-4 prevent diabetes in nonobese diabetic mice with advanced insulinitis. *Hum Gene Ther* 14 (2003) 13-23.
- [39] D.E. Elliott, J. Li, A. Blum, A. Metwali, K. Qadir, J.F. Urban, Jr., and J.V. Weinstock, Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284 (2003) G385-91.
- [40] S.J. Jenkins, and J.E. Allen, Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *J Biomed Biotechnol* 2010 (2010) 262609.
- [41] P. Zacccone, J. Phillips, I. Conget, R. Gomis, K. Haskins, A. Minty, K. Bendtzen, A. Cooke, and F. Nicoletti, Interleukin-13 prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 48 (1999) 1522-8.
- [42] J.A. Emamaullee, J. Davis, S. Merani, C. Toso, J.F. Elliott, A. Thiesen, and A.M. Shapiro, Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 58 (2009) 1302-11.
- [43] D. Bending, H. De La Pena, M. Veldhoen, J.M. Phillips, C. Uyttenhove, B. Stockinger, and A. Cooke, Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest* (2009).
- [44] A. Cooke, Th17 cells in inflammatory conditions. *Rev Diabet Stud* 3 (2006) 72-5.
- [45] R. Jain, D.M. Tartar, R.K. Gregg, R.D. Divekar, J.J. Bell, H.H. Lee, P. Yu, J.S. Ellis, C.M. Hoeman, C.L. Franklin, and H. Zaghouani, Innocuous IFNgamma induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. *J Exp Med* 205 (2008) 207-18.
- [46] M.N. Torrero, M.P. Hubner, D. Larson, H. Karasuyama, and E. Mitre, Basophils amplify type 2 immune responses, but do not serve a protective role, during chronic infection of mice with the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis*. *J Immunol* (in press).
- [47] K.A. Saunders, T. Raine, A. Cooke, and C.E. Lawrence, Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infect Immun* 75 (2007) 397-407.
- [48] P. Zacccone, Z. Fehervari, F.M. Jones, S. Sidobre, M. Kronenberg, D.W. Dunne, and A. Cooke, *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur J Immunol* 33 (2003) 1439-49.
- [49] G.P. Lennon, M. Bettini, A.R. Burton, E. Vincent, P.Y. Arnold, P. Santamaria, and D.A. Vignali, T cell islet accumulation in type 1 diabetes is a tightly regulated, cell-autonomous event. *Immunity* 31 (2009) 643-53.
- [50] Kikutani H, and Makino S, The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv. Immunol.* 51 (1992) 285-322.
- [51] Kinet JP, The high-affinity IgE receptor (FC epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immun.* 17 (1999) 931-72.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-receptor Fc épsilon I (FCERI), o un fragmento de unión al antígeno del mismo, para su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus insulínica dependiente tipo 1 en un sujeto;
5 en el que el anticuerpo anti-FcεRI es un anticuerpo IgG;
en el que el anticuerpo anti-FcεRI, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se administra en una cantidad suficiente para reticularse y agregar el FcεRI de superficie a basófilos y/o mastocitos, activando así los basófilos y/o mastocitos;
10 y en el que el anticuerpo anti-FcεRI, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, se administra de forma crónica al sujeto.
2. El anticuerpo anti-FcεRI para el uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-FcεRI es un anticuerpo monoclonal.
- 15 3. El anticuerpo anti-FcεRI para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo anti-FcεRI es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
4. El anticuerpo anti-FcεRI, o fragmento de unión al antígeno del mismo, para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el FcεRI es un FcεRI humano.
- 20 5. El anticuerpo anti-FcεRI, o fragmento de unión al antígeno del mismo, para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el sujeto es un mamífero.
6. El anticuerpo anti-FcεRI, o fragmento de unión al antígeno del mismo, para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el sujeto es un ser humano.
- 25 7. El anticuerpo anti-FcεRI, o fragmento de unión al antígeno del mismo, para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la administración crónica comprende administrar el anticuerpo anti-FcεRI, o fragmento de unión al antígeno, al sujeto cada semana durante al menos 10 semanas.
- 30 8. El anticuerpo anti-FcεRI, o fragmento de unión al antígeno del mismo, para el uso de la reivindicación 7, en el que la administración crónica comprende administrar el anticuerpo anti-FcεRI, o fragmento de unión al antígeno del mismo, al sujeto una o más veces al día durante al menos cinco días consecutivos.
- 35 9. El anticuerpo anti-FcεRI, o fragmento de unión al antígeno del mismo, para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el anticuerpo anti-FcεRI, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se formula en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

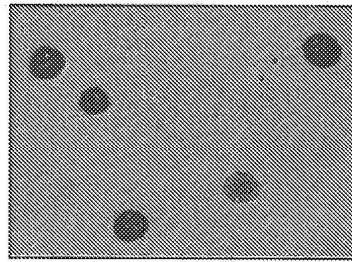


FIG. 1A

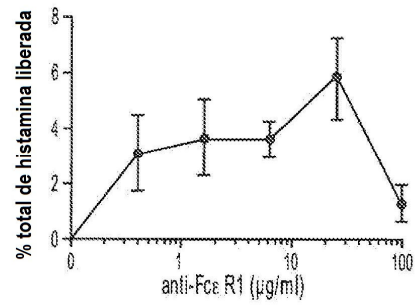


FIG. 1B

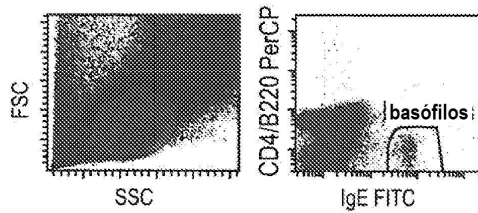
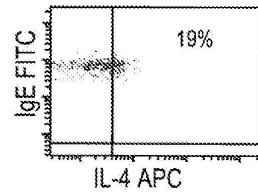


FIG. 1C

ESTIMULADOS CON MEDIO



ESTIMULADOS CON anti-Fcε R1

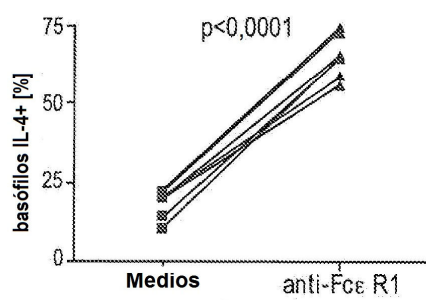
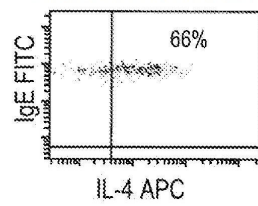


FIG. 1D

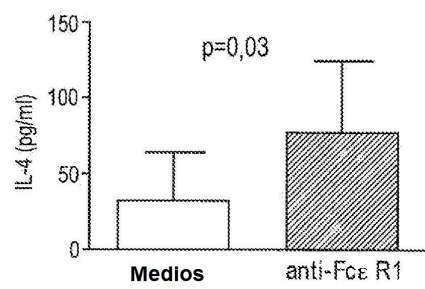


FIG. 1E

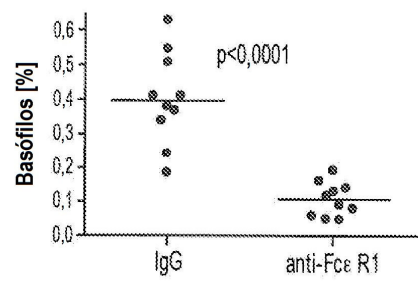


FIG. 2A

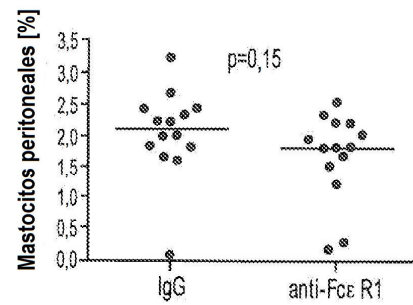


FIG. 2B

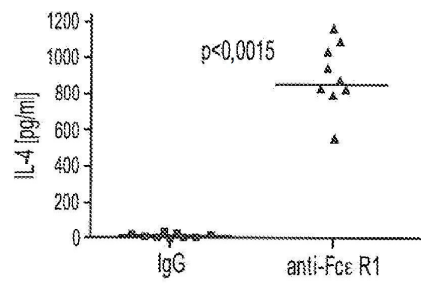


FIG. 2C

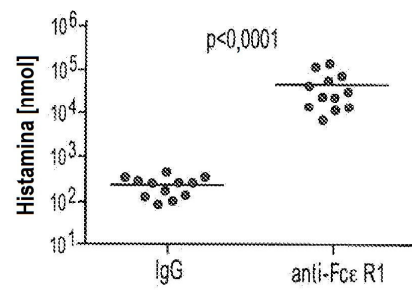


FIG. 2D

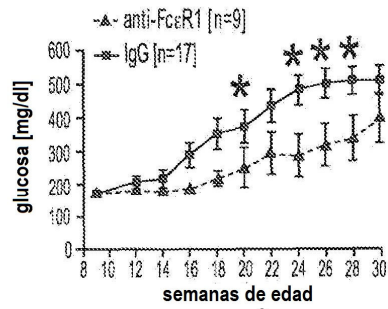


FIG. 3A

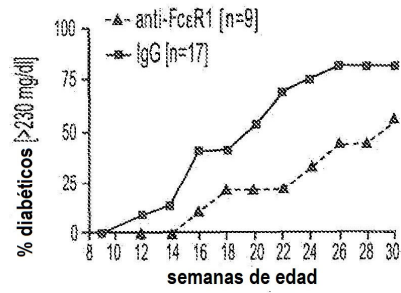


FIG. 3B

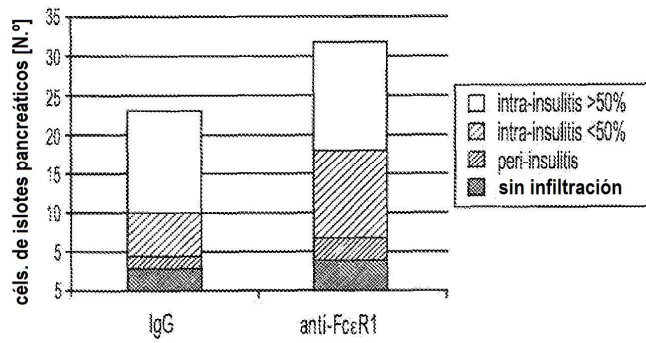


FIG. 3C

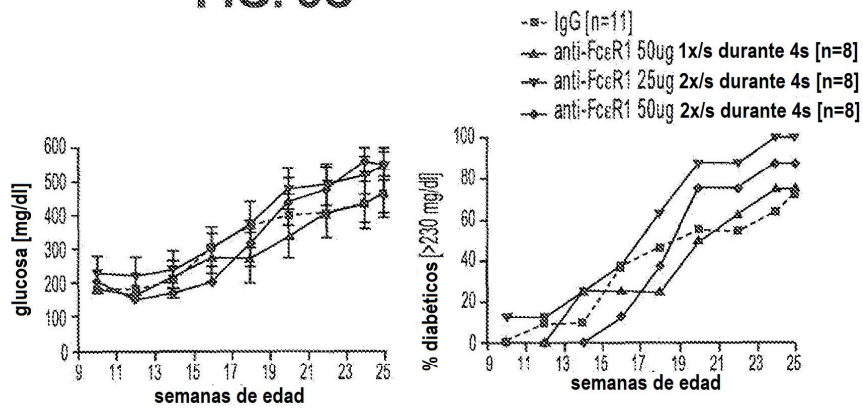


FIG. 3D

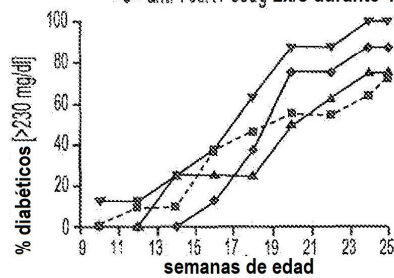
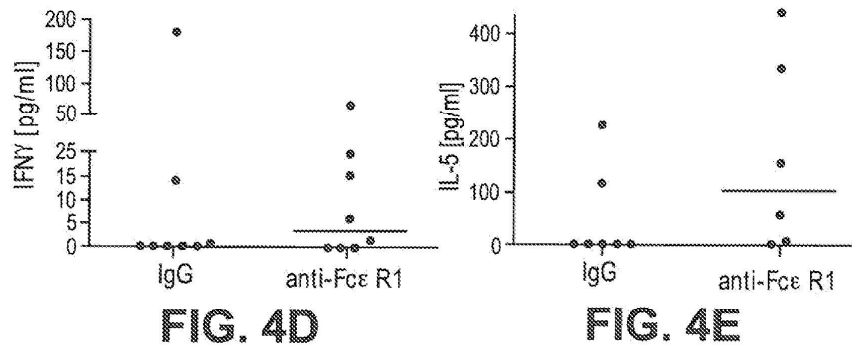
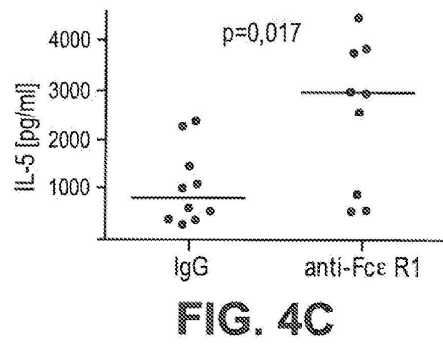
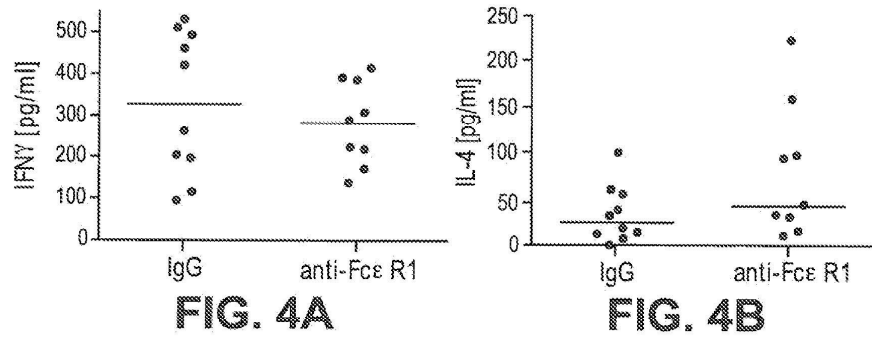


FIG. 3E



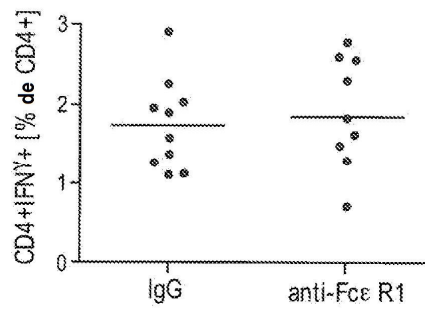


FIG. 4F

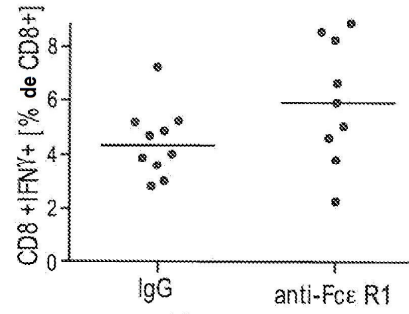


FIG. 4G

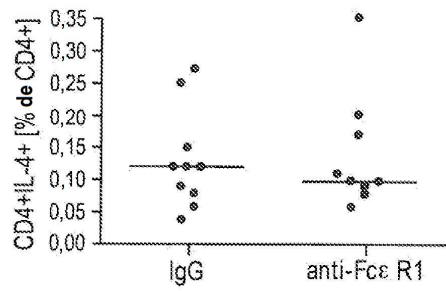


FIG. 4H

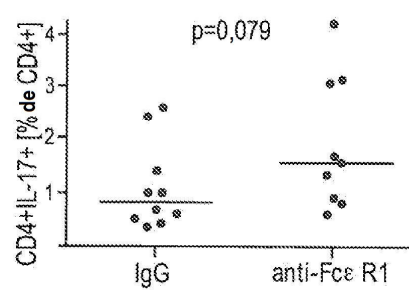


FIG. 4I

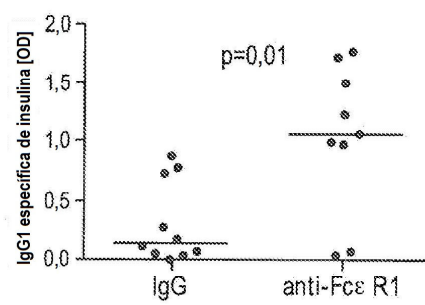


FIG. 4J

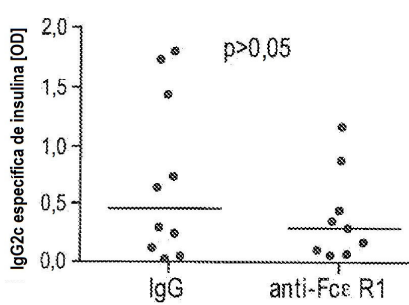


FIG. 4K

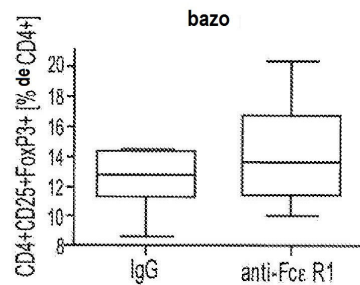


FIG. 5A

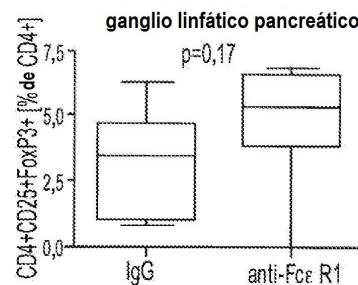


FIG. 5B

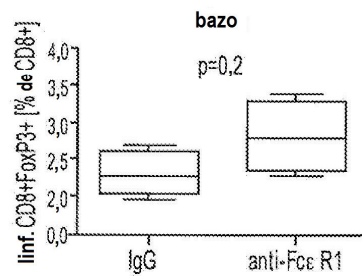


FIG. 5C

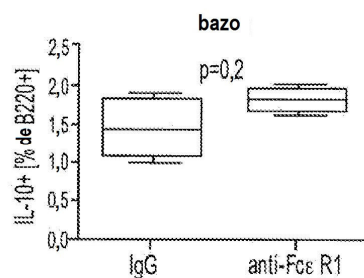


FIG. 5D

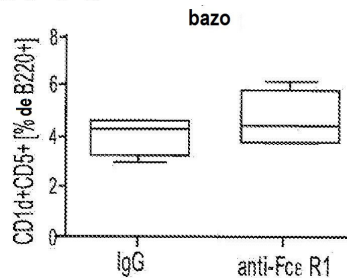


FIG. 5E

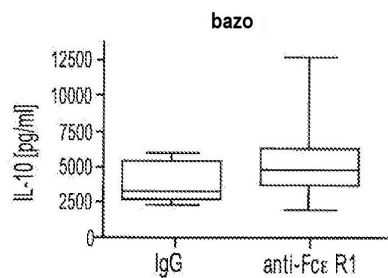


FIG. 5F

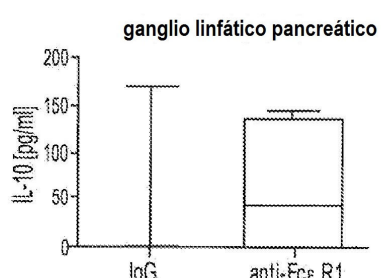


FIG. 5G

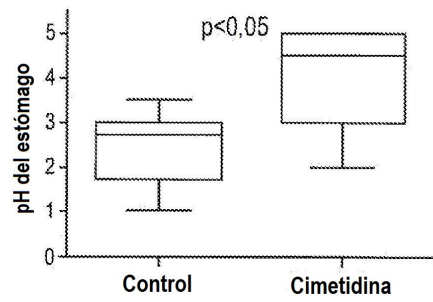


FIG. 6A

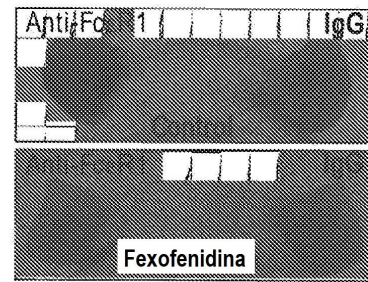


FIG. 6B

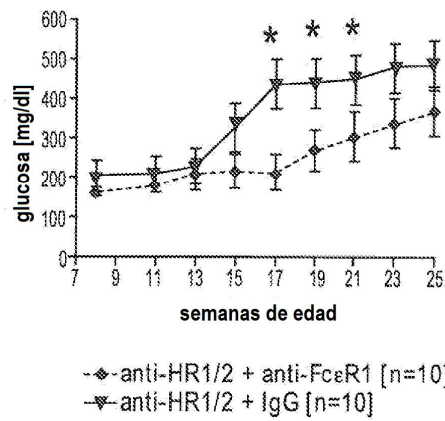


FIG. 6C

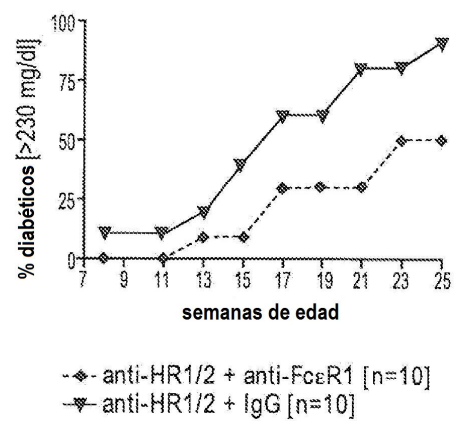


FIG. 6D

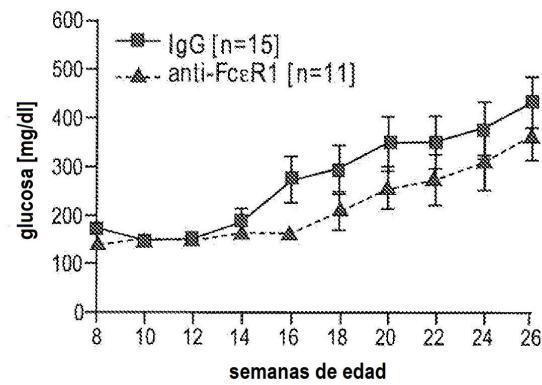


FIG. 7A

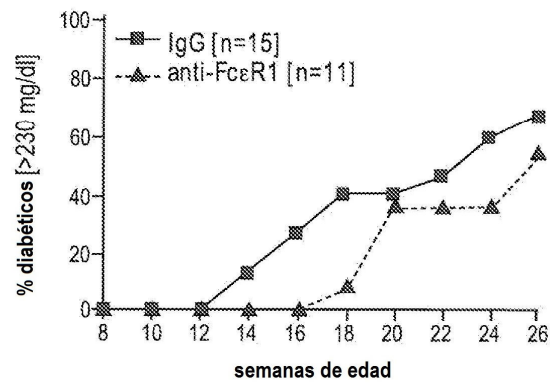


FIG. 7B

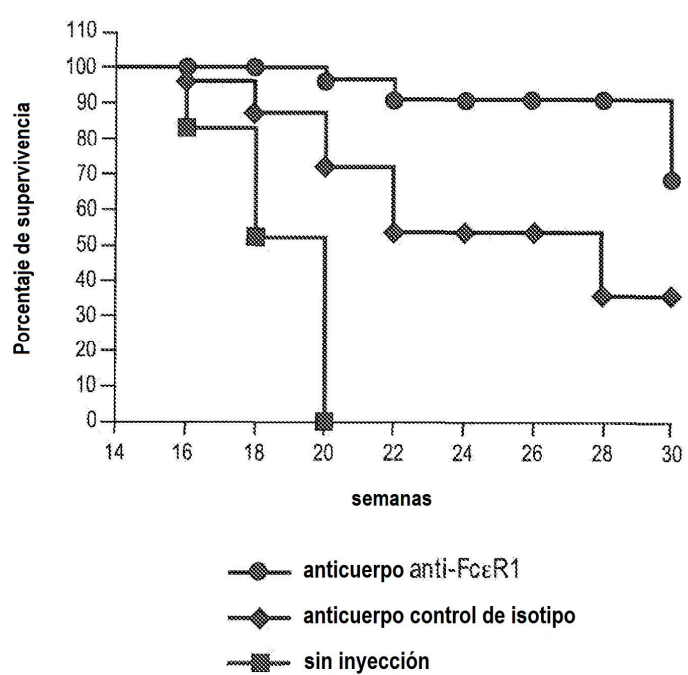


FIG. 8