

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 976**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2013 PCT/EP2013/054697**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13132052**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013 E 13708786 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2822967**

54 Título: **Composiciones que comprenden inmunoglobulinas de tipo secretor**

30 Prioridad:

09.03.2012 EP 12158931
16.05.2012 EP 12168343

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2020

73 Titular/es:

CSL BEHRING AG (100.0%)
Wankdorfstrasse 10
3014 Bern, CH

72 Inventor/es:

CORTHÉSY, BLAISE;
LONGET, STÉPHANIE;
LOETSCHER, MARIUS;
MIESCHER, SYLVIA y
ZUERCHER, ADRIAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 751 976 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

Composiciones que comprenden inmunoglobulinas de tipo secretor

Composiciones

5 La invención se refiere a métodos para preparar las composiciones que comprenden inmunoglobulina de tipo secretor, en particular, IgA de tipo secretor y/o IgM de tipo secretor, y composiciones que se pueden obtener mediante los métodos.

10 La IgA es la segunda clase de Ig más abundante después de IgG en plasma humano, donde se encuentra con una concentración de 0.88-4.10 g/L. Hay dos subclases de IgA, IgA1 e IgA2 (Fig. 1) (Zuercher AW *et al. Plasma derived immunoglobulins. Principles of Immunopharmacology*. 3.^a ed. Birkhäuser, 2011: págs. 271-301) que difieren en sus enlaces disulfuro que unen las cadenas ligeras y pesadas, así como en su diversidad antigénica debido a diferencias significativas en la región bisagra de la molécula. El patrón de glicosilación de las dos subclases es diferente: la cadena pesada de ambas subclases está N-glicosilada; por el contrario, se observa O-glicosilación en IgA1, pero no en IgA2, debido a la región bisagra truncada de IgA2.

15 La IgA humana se encuentra en dos formas mayoritarias: circulando en sangre/plasma, o secretada a las superficies mucosas. En plasma, la IgA se encuentra predominantemente presente en forma de monómeros (80-90%) y es producida por células plasmáticas de la médula ósea; la subclase principal en plasma es IgA1.

La expresión IgA polimérica (plgA) describe IgA diméricas, ocasionalmente tetraméricas, unidas covalentemente en sus "partes de cola" mediante la cadena de unión (J) (Fig. 1).

20 Las moléculas de IgM constituyen un 10% del contenido de Ig en suero total. Están confinados predominantemente en la reserva intravascular y son parte de la respuesta inmunitaria humoral con especificidad antigénica primaria; desde el punto de vista filogenético y ontogenético son las moléculas de anticuerpo (Ab) más antiguas. La IgM existe predominantemente como un pentámero unido por la cadena J y dispuesto en una estructura plana; ocasionalmente, la IgM también se puede encontrar en una forma hexamérica que carece de la cadena J (Zuercher AW *et al. Plasma derived immunoglobulins. Principles of Immunopharmacology*. 3.^a ed. Birkhäuser, 2011: págs. 271-301).

25 Las superficies mucosas de las vías digestivas, respiratorias y urogenitales, así como los conductos de las glándulas exocrinas están recubiertos por capas de células epiteliales que forman una barrera hermética que separa los compartimentos internos del cuerpo del ambiente externo. En los seres humanos, estas extensas superficies ocupan 400 m², un área que está permanentemente expuesta a patógenos exógenos (Corthésy, B. (2010) *Future Microbiol.* 5:817-829). La combinación de mecanismos celulares y moleculares innatos e inducibles garantiza la protección frente a la colonización y entrada/invasión por parte de microbios. En individuos sanos, la IgA secretora (SIgA) es el anticuerpo más abundante (Ab) que cumple la función de exclusión inmunitaria en el lado luminal de las superficies mucosas (Macpherson, A. J., *et al.* (2008) *Mucosal Immunol.* 1:11-22), mientras que los Abs de IgM secretoras dominan en los pacientes con deficiencia de IgA. La SIgA es sintetizada por células plasmáticas de la mucosa de la lámina propia intestinal, el tracto respiratorio superior o el tracto urogenital. La SIgA consta de un dímero de plgA, y un componente secretor muy glicosilado (SC) de aproximadamente 75 kDa (Fig. 1); de forma similar, una IgM que contiene cadenas J pentamérica asociada con SC constituye la SIgM. El SC representa la parte extracelular del receptor de Ig polimérico (plgR). El plgR es necesario para el transporte transepitelial de plgA o IgM pentamérico desde el sitio de producción hasta la superficie de las mucosas en las que el complejo plgR-plgA / plgR-IgM se convierte en SIgA / SIgM mediante escisión enzimática (Zuercher AW *et al. Plasma derived immunoglobulins. Principles of Immunopharmacology*. 3.^a ed. Birkhäuser, 2011: págs. 1-31). La asociación con SC protege la IgA o la IgM de la degradación proteolítica. La SIgA es la Ig predominante en las secreciones de seromucosas tales como saliva, secreciones traqueobronquiales, colostrum, leche, fluido lagrimal, secreciones intestinales y secreciones urogenitales. Es la Ig más predominante producida en los recubrimientos de las mucosas (y por tanto en el cuerpo humano); se secretan aproximadamente 3-5 g de SIgA diariamente en la cavidad intestinal. La SIgA es, por tanto, esencial para la exclusión inmunitaria y para mantener la integridad epitelial. La SIgM se encuentra presente en niveles inferiores, pero cumple las mismas funciones de exclusión inmunitaria que la SIgA.

50 Para unos pocos patógenos tales como *Poliovirus*, *Salmonella* o *influenza*, la protección contra la infección de las mucosas puede ser inducida por la inmunización activa de las mucosas con vacunas autorizadas. Sin embargo, para la mayoría de los patógenos de mucosas, no existen vacunas de mucosas activas disponibles. Como alternativa, se podrían suministrar directamente niveles protectores de Ab a las superficies de las mucosas mediante inmunización pasiva. En la naturaleza, esto tiene lugar fisiológicamente en muchas especies de mamífero mediante transferencia de anticuerpos maternos a su progenie a través de la leche (Brandtzaeg, P. (2003) *Vaccine* 21:3382-3388). Los estudios en seres humanos y animales que utilizan inmunización pasiva de las mucosas han demostrado que las moléculas de anticuerpos plgA y SIgA administradas mediante instilación pulmonar, oral, intranasal o intrauterina pueden prevenir, disminuir o curar infecciones bacterianas y virales (Corthésy, B. (2003) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 4:51-67). Sin embargo, la forma secretora de IgA que se encuentra de forma natural en las superficies de las mucosas raramente se ha utilizado, y la producción a gran escala de SIgA no es posible hasta la fecha. La construcción de SIgA con métodos biotecnológicos es complicada, pero dichas moléculas podrían tener aplicaciones

clínicas importantes (Corthésy, B. (2002) *Trends Biotechnol.* 20:65-71). Lo mismo también se aplica a IgM que contiene componentes secretores. El documento US 8 021 645 B2 se refiere a métodos hipotéticos para la preparación de IgA e IgM secretoras humanas a partir de plasma humano agrupado.

Compendio de la invención

- 5 Los inventores han descubierto de forma sorprendente que es posible combinar inmunoglobulina que contiene cadenas J derivadas de plasma, en particular, IgA y/o IgM, con componente secretor sin necesidad de purificar en primer lugar la inmunoglobulina que contiene cadenas J. Esta invención abre la puerta a la producción a gran escala de IgA y/o IgM de tipo secretor que se pueden utilizar en medicina, por ejemplo, para la prevención y tratamiento de infecciones en las superficies de las mucosas en sujetos, en particular, en sujetos humanos.
- 10 Un aspecto de la invención es un método para producir una composición que comprende inmunoglobulina de tipo secretor, en particular, IgA y/o IgM, *in vitro*, que comprende los pasos de
- (a) obtener una composición proteica derivada de la sangre que comprende inmunoglobulina que contiene cadenas J, en particular, IgA y/o IgM; y
 - (b) mezclar la composición del paso (a) con el componente secretor, donde no se lleva a cabo ningún paso de
- 15 purificación diseñado específicamente para separar polímeros o IgA dimérica que contienen cadenas J de otras proteínas, como la cromatografía de afinidad o exclusión por tamaños y la selección de la fracción de la masa molecular relevante, para obtener la composición del paso (a).

20 Preferentemente, la inmunoglobulina de tipo secretor es IgA de tipo secretor. Preferentemente, la composición del paso (a) contiene al menos un 5% de IgA que contiene cadenas J, más preferentemente al menos un 10%, más preferentemente al menos un 20%, incluso más preferentemente al menos un 30%, de la forma más preferente contendrá al menos un 50% de IgA que contiene cadenas J. Preferentemente, la composición del paso (a) se obtiene a partir de sangre humana, por ejemplo, plasma humano o fracciones de este enriquecidas en IgA o incluso IgA que contiene cadenas J, pero no se requiere purificación de IgA que contiene cadenas J.

25 Preferentemente, la inmunoglobulina de tipo secretor es IgM de tipo secretor. Preferentemente, la composición del paso (a) contiene al menos un 5% de IgM que contiene cadenas J, más preferentemente al menos un 10%, más preferentemente al menos un 20%, incluso más preferentemente al menos un 30%, de la forma más preferente contendrá al menos un 50% de IgM que contiene cadenas J. Preferentemente, la composición del paso (a) se obtiene a partir de sangre humana, por ejemplo, plasma humano o fracciones de este enriquecidas en IgM o incluso IgM que contiene cadenas J, pero no se requiere purificación de IgM que contiene cadenas J.

30 El componente secretor utilizado en el paso (b) es preferentemente componente secretor recombinante, más preferentemente componente secretor recombinante humano, preferentemente producido por una línea celular de mamífero. Sin embargo, también se puede utilizar un componente secretor de una fuente natural tal como un componente secretor purificado a partir de leche, saliva, mucosidad o fuentes similares.

35 La proporción molar entre el componente secretor y cadena J dentro de los dímeros/polímeros de IgA o pentámeros de IgM en la composición del paso (a) oscila entre 1:10 y 10:1, preferentemente entre 1:5 y 5:1, más preferentemente entre 1:2 y 2:1.

En otro aspecto de la invención, la proporción molar entre componente secretor y cadena J dentro de la composición del paso a) oscila entre 1:10 y 10:1, preferentemente entre 1:5 y 5:1, más preferentemente entre 1:2 y 2:1.

40 Otro aspecto de la invención es una composición que comprende IgA de tipo secretor y/o IgM de tipo secretor o combinaciones de estos que se pueden obtener por un método de la invención. La composición puede comprender además un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional de la invención es la composición descrita anteriormente para uso médico.

Descripción detallada de la invención

45 Como ya se ha mencionado anteriormente, los inventores han descubierto sorprendentemente que es posible combinar inmunoglobulinas que contienen cadenas J derivadas de plasma, en particular IgA que contiene cadenas J y/o IgM que contiene cadenas J con componente secretor sin necesidad de purificar en primer lugar la inmunoglobulina que contiene cadenas J. Esta invención abre la puerta a la producción a gran escala de IgA de tipo secretor y/o IgM de tipo secretor que se puede utilizar en medicina, por ejemplo, para la prevención y tratamiento de infecciones en las superficies de las mucosas en algunos sujetos, en particular, en sujetos humanos.

50 Un aspecto de la invención es un método para producir una composición que comprende inmunoglobulina de tipo secretor, en particular, IgA de tipo secretor o IgM de tipo secretor, *in vitro*, que comprende los pasos de

- (a) Obtener una composición de proteínas derivadas de la sangre que comprende IgA que contiene cadenas J o IgM que contiene cadenas J,

(b) mezclar o combinar la composición del paso (a) con un componente secretor, donde no se lleva a cabo ningún paso de purificación diseñado específicamente para separar polímeros o IgA dimérica que contienen cadenas J de otras proteínas, como cromatografía de afinidad o exclusión por tamaños y selección de la fracción de la masa molecular relevante, para obtener la composición del paso (a).

5 Preferentemente, la composición del paso (a) contiene al menos un 5% (p/p) de IgA que contiene cadenas J, más preferentemente al menos un 10%, más preferentemente al menos un 20%, incluso más preferentemente al menos un 30%, más preferentemente al menos un 50%, de la forma más preferente contendrá al menos un 70% de IgA que contiene cadenas J. Preferentemente, la composición del paso (a) se obtiene a partir de sangre humana, por ejemplo, plasma humano o fracciones de estos enriquecidas en IgA o incluso IgA que contiene cadenas J, pero no se requiere ningún paso de purificación específico para los polímeros o dímeros de IgA que contienen cadenas J. Por lo tanto, la IgA que contiene cadenas J estará en una composición que también comprende otras proteínas tales como IgA, IgM o IgG monoméricas. Por ejemplo, la composición puede comprender más de un 10% de IgA monomérica y/o más de un 10% de IgG, y/o más de un 10% de IgM. Aunque puede tener lugar un enriquecimiento en IgA dimérica que contiene cadenas J como parte del procesamiento de las fracciones de plasma humano para la purificación de proteínas plasmáticas tales como IgG, albúmina, alfa-1-antitripsina y factores de coagulación, no es necesario ningún paso de purificación diseñado específicamente para separar polímeros o IgA dimérica que contienen cadenas J de otras proteínas, como cromatografía de afinidad o exclusión por tamaños y selección de la fracción de la masa molecular relevante para obtener la composición del paso (a).

20 En otro aspecto preferido de la invención, la composición del paso (a) contiene al menos un 5% (p/p) de IgM que contiene cadenas J, más preferentemente al menos un 10%, más preferentemente al menos un 20%, incluso más preferentemente al menos un 30%, más preferentemente al menos un 50%, de la forma más preferente contendrá al menos un 70% de IgM que contiene cadenas J. Preferentemente, la composición del paso (a) se obtiene a partir de sangre humana, por ejemplo, plasma humano o fracciones de este enriquecidas en IgM o incluso IgM que contiene cadenas J, pero no se requiere ningún paso de purificación específico para la IgM que contiene cadenas J. Por lo tanto, la IgM que contiene cadenas J estará en una composición que también comprende otras proteínas tales como IgA o IgG. Por ejemplo, la composición puede comprender más de un 10% de IgA, y/o más de un 10% de IgG. Aunque puede tener lugar un enriquecimiento en IgM que contiene cadenas J como parte del procesamiento de fracciones de plasma humano para la purificación de proteínas plasmáticas tales como IgG, albúmina, alfa-1-antitripsina y factores de coagulación, no es necesario ningún paso de purificación diseñado específicamente para separar la IgM que contiene cadenas J de otras proteínas, como cromatografía de afinidad o exclusión por tamaños y selección de la fracción de la masa molecular relevante para obtener la composición del paso (a).

35 La expresión "componente secretor", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una proteína que se une específicamente a inmunoglobulina que contiene cadenas J, y está relacionada con una parte extracelular del receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR) o se puede obtener a partir de ella o es idéntica a ella, preferentemente una pIgR de mamífero, más preferentemente, una pIgR de primate, de la forma más preferente una pIgR humana. Preferentemente, el componente secretor confiere una estabilidad mayor a la inmunoglobulina que contiene cadenas J. El componente secretor comprendido en la composición puede ser componente secretor recombinante, preferentemente componente secretor producido en una línea celular de mamífero. El componente secretor en su significado tradicional restringido (denominado "componente secretor natural" en la presente) es la parte extracelular del receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR), que normalmente se asocia durante la secreción con IgA polimérica o dimérica o IgM pentamérica que comprende una cadena J. La IgA/IgM que contiene cadenas J se une al receptor de inmunoglobulina polimérica en la superficie basolateral de las células epiteliales y se incorpora a la célula por transcitosis. Este complejo receptor se desplaza posteriormente a través de los compartimentos celulares antes de ser transportado a la superficie luminal de las células epiteliales. El complejo 45 IgA/IgM-pIgR transcitosado se libera a continuación mediante proteólisis, y parte del receptor de inmunoglobulina polimérico (pIgR) denominado componente secretor natural, permanece asociado con la IgA/IgM que contiene cadenas J, liberando IgA/IgM secretoras. Sin embargo, existe evidencia de que la transcitosis inversa de IgA, es decir, de la superficie luminal a la superficie basolateral, también puede tener lugar.

50 La pIgR humana es clonada y secuenciada, su secuencia está disponible como la entrada P01833 en SwissProt, y se muestra en la Seq ID NO: 1. La pIgR humana es una glicoproteína con 764 residuos de aminoácidos, que contiene un péptido señal (residuos 1 a 18), una parte extracelular (residuos 19 a 638), una región transmembrana (residuos 639 a 661), y una región citoplasmática (residuos 662 a 764). Se cree que los residuos 19 a 603 se asocian con IgA que contiene cadenas J tal como se han descrito anteriormente, y esta parte de esta glicoproteína se denomina normalmente componente secretor (denominado "componente secretor natural" en la presente).

55 El componente secretor utilizado en la composición de la invención puede comprender cualquier secuencia de pIgR extracelular capaz de asociarse con IgA que contenga cadenas J. Por ejemplo, el componente secretor puede comprender dominios extracelulares de pIgR de fuentes de mamífero, por ejemplo, de primates, ganado vacuno, caballos, gatos, perros, conejos, cerdos de guinea, ratas o ratones, o variantes de estos. También se contemplan híbridos funcionales de los dominios extracelulares de varias especies de mamíferos o variantes de estos para su uso en la invención, p. ej., preparados mediante la fusión de dominios de tipo inmunoglobulina de especies diferentes en una proteína de tipo componente secretor. Un componente secretor funcional también se puede formar fusionando una selección de dominios de tipo inmunoglobulina presentes normalmente, por ejemplo, un componente

secretor de conejo es funcional, estando compuesto solamente de los dominios 1, 4 y 5. Preferentemente, sin embargo, se utiliza el componente secretor humano o variantes funcionales de este.

Por lo tanto, el componente secretor utilizado en la composición de la invención comprende preferentemente los residuos 19 a 603 de la SEQ ID NO: 1 o variantes funcionales de estos. Las variantes funcionales pueden incluir delecciones, inserciones y/o sustituciones, preferentemente las sustituciones son sustituciones conservadoras, por ejemplo, un residuo aminoácido básico se sustituye por otro aminoácido básico, un aminoácido hidrófobo se sustituye por otro aminoácido hidrófobo, etc. El componente secretor variante es al menos un 50% idéntico en su secuencia a los residuos 19 a 603 de la SEQ ID NO: 1, preferentemente al menos un 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, más preferentemente al menos un 85% o incluso un 90%, incluso más preferentemente al menos un 92%, 94%, 95%, 97%, 98% o incluso un 99% idéntico a los residuos 19 a 603 de la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, el componente secretor comprende la parte extracelular de la pIgR, más preferentemente la parte extracelular del pIgR humano, de la forma más preferente, el componente secretor comprende o incluso está constituido por los residuos 19 a 603 de la SEQ ID NO: 1.

El experto sabe bien cómo producir el componente secretor mediante técnicas recombinantes. Un ejemplo de la expresión del componente secretor humano en células CHO ha sido descrito por Phalipon *et al* (Phalipon A *et al* (2002) *Immunity* 17:107-115), pero la invención no se limita al componente secretor producido por este sistema. Por ejemplo, la secuencia de ADNc deseada se puede producir de forma sintética o clonarse mediante RT-PCR, utilizando ARN aislado de células o tejido que expresa pIgR como molde. El ADNc a continuación se puede insertar en un vector de expresión de mamíferos tal como pcADN3; existen muchos vectores de expresión alternativos. El vector de expresión recombinante se introducirá entonces en una línea celular hospedadora adecuada tal como CHO, Cos, HEK293 o BHK. Existen otras líneas celulares disponibles y también se pueden utilizar. Los métodos para introducir dichos vectores en una línea celular incluyen lipofección, electroporación y otras técnicas muy conocidos para el experto. Habitualmente, a continuación, se seleccionan y se clonan las células que albergan el vector de expresión y que expresan la proteína de interés. También se pueden utilizar sistemas de expresión viral, por ejemplo, se puede utilizar el virus *vaccinia* para expresar proteínas en niveles elevados en células de mamíferos, se pueden utilizar sistemas de expresión de baculovirus para expresar proteínas en niveles elevados en células de insecto. También se pueden contemplar sistemas de expresión de levaduras o bacterias, y dichos sistemas de expresión son conocidos para el experto. Del mismo modo, se pueden contemplar también sistemas de expresión vegetal, y dichos sistemas son conocidos para el experto.

El componente secretor o variante de este utilizado en la composición de la invención puede también comprender una etiqueta tal como una etiqueta de hexahistidina, que puede contribuir a la purificación de la proteína resultante. Si se une una etiqueta de este tipo a través de un conector escindible, la etiqueta se puede escindir antes del uso en la invención. De forma similar, el componente secretor se puede producir como una proteína de fusión. De nuevo, se puede utilizar un conector escindible de modo que la pareja de fusión se pueda escindir del componente secretor antes del uso en la invención.

El experto puede purificar a continuación la proteína expresada con métodos estándar. El componente secretor recombinante se puede purificar hasta una pureza elevada con un método adecuado, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico y/o exclusión por tamaño. Preferentemente, el preparado final de componente secretor recombinante estará esencialmente exento de contaminantes, particularmente proteínas de la célula hospedadora. Sin embargo, el componente secretor también se puede asociar específicamente con inmunoglobulina que contiene cadenas J en forma no purificada, por lo tanto, la purificación antes de la asociación con la inmunoglobulina que contiene cadenas J no es esencial.

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

La proporción molar entre componente secretor y cadena J dentro de los dímeros/polímeros de IgA o los pentámeros de IgM en la composición del paso (a) oscila entre 1:10 y 10:1, preferentemente entre 1:5 y 5:1, más preferentemente entre 1:2 y 2:1.

La proporción molar entre componente secretor y cadena J dentro de la composición del paso (a) se encuentra entre 1:10 y 10:1, preferentemente entre 1:5 y 5:1, más preferentemente entre 1:2 y 2:1.

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

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende IgA de tipo secretor que se puede obtener mediante un método de la invención. Otro aspecto más de la invención es una composición que comprende IgM de tipo secretor que se puede obtener mediante un método de la invención. Otro aspecto adicional es una composición que comprende IgA de tipo secretor e IgM de tipo secretor que se puede obtener mediante un método de la

invención, por ejemplo, en una proporción molar de entre 10:1 y 1:10, preferentemente entre 5:1 a 1:5, más preferentemente de entre 2:1 y 1:2. En otro aspecto de la invención, el contenido combinado de IgA e IgM en la composición excede un 50%, preferentemente un 60%, más preferentemente un 70%, incluso más preferentemente un 80%, incluso más preferentemente un 90%, de la forma más preferente es un 100%.

- 5 Un aspecto adicional de la invención es la composición descrita anteriormente para uso médico. Por ejemplo, las composiciones de la invención se pueden utilizar convenientemente para tratar la enterocolitis necrotizante, y generalmente infecciones en las superficies de las mucosas.

La composición puede comprender además uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, y/o un estabilizador. La composición se puede formular en forma líquida, como un jarabe, una loción, una pomada, un polvo que se puede reconstituir con un líquido antes de la administración, una cápsula, una píldora, un gel, una crema, una gelatina, una formulación de liberación controlada u otra formulación adecuada para el uso médico previsto. Por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades GI, la composición se puede formular con un recubrimiento protector que se disuelve en el área deseada del tracto GI para liberar la composición. La composición puede tomarse oralmente, administrarse por vía tópica, enteral, por inhalación u otra vía adecuada para el uso previsto. Para la aplicación oral, se pueden coadministrar inhibidores de la bomba ácida.

Las proteínas en la composición se pueden concentrar, por ejemplo, utilizando dia/ultrafiltración u otros métodos estándar, antes de formularse. Además, la composición puede liofilizarse, y posteriormente reconstituirse con una solución adecuada antes de su uso.

Definiciones

20 Se pretende que la expresión "IgA de tipo secretor" o "IgA plasmático de tipo secretor" englobe IgA (plasmática) que contiene cadenas J con una proteína que es un componente secretor o una variante funcional de este, que sirve para proporcionar alguna protección frente a la digestión proteolítica. Habitualmente, la IgA que contiene cadenas J comprenderá dos o cuatro, o incluso más monómeros de IgA. Habitualmente, la IgA que contiene cadenas J se mezclará con un componente secretor o una variante de este *in vitro*, es decir, la asociación entre componente secretor e IgA que contiene cadena J tiene lugar *in vitro*, en lugar de durante la transcitosis.

25 Se pretende que la expresión "IgM de tipo secretor" englobe IgM (plasmática) que contiene cadenas J combinadas con un componente secretor o una variante funcional de este *in vitro*. Preferentemente, la IgM que contiene cadenas J será IgM pentamérica.

30 La expresión "pasos de purificación específicos para dímeros o polímeros de IgA que contienen cadenas J" se refieren a pasos de purificación que se incluirían en un proceso de purificación diseñado específicamente para separar dímeros o polímeros de IgA que contienen cadenas J de otras proteínas, tales como IgA monoméricas, otras inmunoglobulinas, y otras proteínas plasmáticas. Tales pasos de purificación específicos pueden, por ejemplo, incluir cromatografía de afinidad con un ligando que se une específicamente a cadena J, o cromatografía de exclusión por tamaños que seleccionen las fracciones que contengan proteínas de un peso molecular que corresponden a dímeros de IgA que contienen cadenas J. Aunque el proceso para preparar la composición a partir de plasma puede comprender métodos que den lugar a un enriquecimiento de IgA o incluso IgA que contiene cadenas J tales como cromatografía de intercambio iónico, la IgA que contiene cadenas J no se purifica específicamente. Por tanto, la expresión "IgA que contiene cadenas J en una forma no purificada" se refiere a una composición que contiene menos de un 80% de IgA que contiene cadenas J, habitualmente menos de un 70%, 60% o 50% de IgA que contiene cadenas J, puede incluso contener menos de un 40%, 30%, 25%, 20%, 15% o incluso un 10% de IgA que contiene cadenas J.

45 La expresión "pasos de purificación específicos para IgM que contiene cadenas J" se refiere a los pasos de purificación que se incluirían en un proceso de purificación diseñado específicamente para separar IgM que contiene cadenas J de otras proteínas tales como otras inmunoglobulinas y otras proteínas plasmáticas. Tales pasos de purificación específica pueden, por ejemplo, incluir cromatografía de afinidad con un ligando que se une específicamente a IgM o a una cadena J, o cromatografía de exclusión de tamaños que selecciona las fracciones que contienen proteínas de un peso molecular correspondiente a pentámeros de IgM que contienen cadenas J. Aunque el proceso para preparar la composición a partir de plasma puede comprender métodos que den lugar a un enriquecimiento de IgM que contiene cadenas J tal como cromatografía de intercambio iónico, la IgM que contiene cadenas J no se purifica específicamente. Por tanto, la expresión "IgM que contiene cadenas J en una forma no purificada" se refiere a una composición que contiene menos de un 80% de IgM que contiene cadenas J, habitualmente menos de un 70%, 60% o 50% de IgM que contiene cadenas J, puede incluso contener menos de un 40%, 30%, 25%, 20%, 15% o incluso un 10% de IgM que contiene cadenas J.

55 La expresión "componente secretor", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una proteína que se une específicamente a inmunoglobulina que contiene cadenas J, y está relacionado con una parte extracelular del receptor de inmunoglobulina polimérica (plgR) o se puede obtener a partir de ella o es idéntico a ella, preferentemente un plgR de mamífero, más preferentemente un plGR de primate, de la forma más preferente un plgR de humano. Preferentemente, el componente secretor confiere una estabilidad mayor a la inmunoglobulina que

5 contiene cadenas J. Tal como se ha detallado anteriormente, el componente secretor más preferido es componente secretor humano, por ejemplo, correspondiente a los residuos 19 a 603 de la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, se pueden incluir deleciones, inserciones, sustituciones de aminoácidos, siempre que den lugar a una proteína funcional, es decir, una que aún sea capaz de asociarse con la IgA que contiene cadenas J y preferentemente conferirle protección frente a la digestión proteolítica. Los homólogos de otras especies de mamífero también se incluyen, al igual que las proteínas quiméricas que comprenden partes de especies diferentes.

El término “% [porcentaje]” cuando se utiliza para describir el contenido de inmunoglobulina en una composición/preparado se refiere a proteína en peso por peso.

Lista de Figuras

10 La invención se ilustrará a continuación con los siguientes ejemplos no limitantes, haciendo referencia a las siguientes figuras y listado de secuencias:

La Figura 1 muestra un diagrama de la estructura de IgA secretora que contiene cadenas J monomérica y dimérica.

La Figura 2 muestra transferencias de Western de diferentes preparados de IgA, desarrollados con diferentes anticuerpos:

- 15
- La Fig. 2A muestra una transferencia de Western de diferentes preparados de IgA diferentes, desarrollados con anticuerpos anti-cadena α , anti-cadena J o anti-componente secretor.
 - La Fig. 2B muestra una transferencia de Western de diferentes preparados de IgA secretora y de tipo secretor, desarrollados con un anticuerpo anti-componente secretor.
- 20
- La Fig. 2C muestra una transferencia de Western de diferentes fracciones de cromatografía de exclusión por tamaños de IgAF5 de tipo secretor, desarrolladas con anticuerpos para el componente secretor, la cadena α y la cadena J.
 - La Fig. 2D muestra un cromatograma de un experimento de cromatografía de exclusión por tamaños de IgAF5 de tipo secretor.

La Figura 3 muestra transferencias de puntos, utilizando componente secretor inmovilizado:

- 25
- La Fig. 3A muestra un diagrama de flujo de cómo se configuró el ensayo
 - La Fig. 3B muestra SC que captura IgA que contiene cadenas J
 - La Fig. 3C muestra SC que captura IgM que contiene cadenas J

30 La Figura 4 muestra transferencias de Western de experimentos cronológicos de diferentes preparados de IgA (A) o preparados de IgM (B) incubados con lavados intestinales. Las transferencias se desarrollaron utilizando anticuerpos anti-cadena pesada.

La Figura 5 muestra la protección frente a la infección con *Shigella* con diferentes preparados de IgA:

- La Fig. 5A muestra la disminución en la resistencia transepitelial con *Shigella* en monocapas de Caco-2 polarizadas, y la protección frente a dicha disminución en TER con SIgA anti-*Shigella* (remítase a Phalipon A et al (1995) *J. Exp. Med.* 182:769-778), IgAF5 y SIgAF5.
- 35
- La Fig. 5B muestra la reducción de bacterias unidas e internalizadas con IgAF5, SIgAF5 y SIgA anti-*Shigella*.

La Figura 6 muestra imágenes de *Shigella* en complejos inmunitarios obtenidos después de la incubación con SIgA anti-*Shigella* (SIgAC5) utilizados como un control positivo e IgAF5 polimérica, SIgAF5, IgAF5 monomérica e IgG derivados de plasma.

40 La Figura 7 muestra la secreción de la citocina TNF- α y las quimiocinas CXCL8 y CCL3 mediante monocapas de células epiteliales Caco-2 polarizadas expuestas a *Shigella* sola o en forma de complejo con varios Ab.

La Figura 8 muestra la protección frente a la infección con *Shigella* mediante preparados de IgM y SIgM pentamérica.

- 45
- La Fig. 8 muestra la disminución en la resistencia transepitelial con *Shigella* en monocapas de Caco-2 polarizadas, y la protección frente a dicha disminución en TER con SIgA anti-*Shigella* (remítase a Phalipon A et al (1995) *J. Exp. Med.* 182: 769-778), IgM y SIgM.

La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia proteica de pIgR humana.

Ejemplos

Ejemplo 1: Transferencia de Western de preparados de IgA a partir de plasma mezclado con componente secretor recombinante

Materiales y métodos

- 5 1.1 Preparación de IgA a partir de plasma mediante cromatografía de afinidad y/o mediante elución secuencial de columna MPHQ

Se purificó IgA de plasma humano mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de IgA humana CaptureSelect (Bioaffinity Company BAC, Naarden, Países Bajos) de acuerdo con el protocolo del fabricante de la resina utilizando 3 fuentes diferentes de IgA plasmática como material de partida, concretamente plasma crioprecipitado, pasta de fraccionamiento en etanol frío resolubilizada o una fracción de separación de una columna de cromatografía de intercambio aniónico (AIEX) obtenida mediante esterilización de dicha columna, de acuerdo con el proceso de purificación de IgG comercial aplicado de CSL Behring AG (Berna, Suiza). En resumen, el plasma agrupado crioprecipitado, la pasta resolubilizada o la fracción de separación de AIEX se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) hasta una concentración de IgA de aproximadamente una concentración de 1 mg/mL y a continuación se cargó en una columna de IgA humana CaptureSelect equilibrado con PBS, sin exceder la capacidad de unión de IgA de la columna. Después de cargar la columna, se lavó con PBS, y la IgA se eluyó con tampón de glicina a pH 3. El eluato se ajustó con Tris 0.5 M (pH 8) a pH 4.5 y se concentró hasta una concentración de proteína de 16 mg/mL en PBS. Se purificó SIgA a partir de leche humana mediante el mismo método.

A partir del paso de cromatografía AIEX del proceso de fabricación de IVIg de CSL Behring AG (Berna, Suiza), se obtuvo la fracción F4 después de un poslavado de la columna Macro-Prep High Q (Bio-Rad, Hercules, CA) con fosfato 10 mM / acetato 30 mM a pH 6.5 mediante elución con tartrato 55 mM / acetato 5 mM a pH 7.6. A continuación, la fracción F5 se eluyó con fosfato 50 mM / citrato 25 mM a pH 5.0. Las F4 y F5 se llevaron hasta una concentración de aproximadamente 1 mg/mL en PBS mediante ultra-/diafiltración, y a continuación se eliminó la IgG mediante cromatografía de afinidad utilizando resina IgSelect (GE Healthcare, Glattbrugg, Suiza). La IgAF4 se recolectó directamente en la fracción que atravesó la columna de la cromatografía IgSelect de la carga de F4. Para obtener IgAF5, se eliminó la IgM de la fracción que atravesó la columna IgSelect de la carga de F5 mediante cromatografía de afinidad utilizando resina de IgM humana CaptureSelect (Bioaffinity Company BAC). La IgAF4 y la IgAF5 se llevaron hasta concentraciones finales mediante ultra-/diafiltración.

1.2 Preparación de IgM a partir de plasma mediante cromatografía de afinidad

30 Se purificó IgM de plasma humano mediante cromatografía de afinidad utilizando resina de IgM humana CaptureSelect (Bioaffinity Company BAC, Naarden, Países Bajos) de acuerdo con el protocolo del fabricante de la resina utilizando las mismas 3 fuentes diferentes como material de partida tal como se ha descrito en la sección 1.1 para IgA, concretamente plasma crioprecipitado, pasta de fraccionamiento en etanol frío resolubilizada, o una fracción de separación de una columna de cromatografía de intercambio aniónico (AIEX) obtenida mediante esterilización de dicha columna, de acuerdo con el proceso de purificación de IgG comercialmente de CSL Behring AG (Berna, Suiza). En resumen, el plasma agrupado crioprecipitado, la pasta resolubilizada o la fracción de separación de AIEX se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) hasta una concentración de IgM de aproximadamente 1 mg/mL y a continuación se cargó en una columna de IgM humana CaptureSelect equilibrada con PBS, sin exceder la capacidad de unión de IgM de la columna. Después de cargar la columna se lavó con PBS, y la IgM se eluyó con tampón de glicina a pH 3. El eluato se ajustó con Tris 0.5 M (pH 8) a pH 4.5 y se concentró hasta una concentración de proteína de 10 mg/mL en PBS.

1.3 Transferencias de Western

El SDS-PAGE y la electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (NC) se llevaron a cabo utilizando el sistema Mini-Cell de Invitrogen (Carlsbad, CA) de acuerdo con los protocolos del fabricante. En resumen, las muestras se desnaturalizaron en tampón de muestra en condiciones reductoras o no reductoras, respectivamente, y se separaron electroforéticamente, en geles de gradiente preformados, NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% 1.0 mm 10 pocillos, utilizando tampón de electroforesis NuPAGE MOPS (Invitrogen). Se llevó a cabo una transferencia en húmedo a membranas de NC (0.2 µm) se llevó a cabo con el Módulo de transferencia XCell II (Invitrogen) y tampón de transferencia NuPAGE. A continuación, las membranas se bloquearon durante 30 min en solución de PBS-0.5% de Tween 20 (PBS-T) que contiene un 4% de polvo de leche desnatada Rapilait (Migros, Suiza). Para los anticuerpos de conejo policlonales de la inmunotransferencia se utilizaron: 1) cadena alfa antihumano de conejo (Dako, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP): dilución 1/5000); 2) cadena J antihumana de conejo (BioGenex, Fremont, CA; dilución 1/300) seguida de antisuero conjugado con HRP anticonejo secundario (Sigma; dilución 1/10 000); 3) SC antihumano de conejo (Dako; dilución 1/5000), seguido de antisuero conjugado con HRP anticonejo secundario (Sigma; dilución 1/10 000). Todas las incubaciones se llevaron a cabo en PBS-T que contenía un 4% de leche en polvo a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Después de un lavado final con PBS-T, la inmunodetección en las membranas se reveló mediante quimioluminiscencia y se registró digitalmente en un sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Lifesciences).

1.4 Asociación de IgA derivada de plasma con componente secretor recombinante

Se obtuvo IgA de tipo secretor combinando *in vitro* 100 mg de IgAF5 con 4 mg de componente secretor humano recombinante (recSC). La asociación se llevó a cabo en PBS durante 30 min a temperatura ambiente tal como se ha descrito anteriormente en (Crottet, P., y Corthésy, B. (1998) *J. Immunol.* 161:5445-5453).

5 1.5 Fraccionamiento por cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)

Se inyectó IgA de tipo secretor que comprendía IgAF5 (asociada *in vitro* con recSC) con una concentración de 200 µg/20 µL en un sistema de HPLC de Agilent Technologies 1050 para una cromatografía de exclusión por tamaños a un caudal de 1.5 mL/min sobre una columna TSKgel G3000SWXL de 7.8 mm de DI x 30 cm (Tosoh Bioscience). Se recogieron fracciones de 0.75 mL entre 8.0 y 13.5 min de tiempo de retención en intervalos de 30 s.

10 Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 2. La Figura 2A demuestra una comparación de IgA purificada mediante cromatografía de afinidad a partir de plasma, a partir de pasta resolubilizada y a partir de fracción de separación de AIEX o mediante elución secuencial para obtener IgAF5 tal como se describe en el apartado 1.1 con SIgA de leche humana. El componente secretor se encontraba en SIgA de la leche, pero no en ninguna de las fracciones de IgA purificadas a partir de plasma humano. Todos los preparados contenían la misma cantidad de cadena pesada/cadena alfa de IgA. Tal como se esperaba, la SIgA de leche contenía la cantidad más elevada de cadena J, ya que se espera que esencialmente todas las moléculas de IgA estén presentes como dímeros que contienen cadenas J. La cantidad de cadena J y, por tanto, de dímeros de IgA que contienen cadenas J en IgA purificada a partir de plasma fue baja. Esto es esperado, ya que solamente una pequeña parte de la IgA plasmática se encuentra presente en forma dimérica. Un contenido similar de cadena J se observó en IgA purificada a partir de pasta resolubilizada. Sorprendentemente, una fracción mayor de IgA estaba presente en forma de dímeros que contenían cadenas J en la fracción de separación de la columna, como se evidencia por la cantidad mayor de cadena J. Sorprendentemente, esta aumentó más en la IgAF5. Esta acumulación tuvo lugar sin aplicación de un paso de proceso específico para su enriquecimiento.

25 La Figura 2B muestra que no había IgA que contuviera componente secretor presente en IgAF5. Después de la asociación con recSC se encontraron recSC libre (75 kDa) e IgA dimérica asociada con recSC. De hecho, la IgA plasmática de tipo secretor parecía similar a SIgA de la leche. Se estimó que en la preparación de IgAF5 utilizada en el experimento mostrado, el contenido de IgAF5 que contiene cadenas J fue de aproximadamente un 20%. De hecho, la fuerza de la señal observada en el carril 2 fue comparable con la señal de SIgA de leche humana diluida 1:5.

30 La Figura 2C muestra el contenido de SC, cadena alfa y cadena J de IgA en fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión por tamaños de IgAF5 de tipo secretor. Se observó recSC en las primeras fracciones correspondientes a formas de peso molecular elevado de IgA, probablemente formas poliméricas y diméricas. La aparición de SC coincidía con la aparición de la cadena J, lo que indicaba que, de hecho, la fracción que contenía SC de IgAF5 era la fracción que contenía cadenas J dimérica. Además, se detectó cadena alfa de IgA en las fracciones de menor peso molecular, que comprendía probablemente la fracción monomérica de IgAF5; estas fracciones estaban desprovistas de SC y cadena J. Estos datos demuestran que el recSC mezclado con IgA derivado de plasma que contenía formas monoméricas y diméricas de IgA asociadas de forma específica con las formas que contenían cadenas J diméricas de IgA.

40 La Figura 2D muestra el cromatograma del experimento de SEC durante el cual se recogieron las fracciones entre el tiempo de retención de 8.0 min y de 13.5 min. Se indican los picos que representan polímeros, dímeros y monómeros de IgA.

Ejemplo 2: Ensayo de reasociación por transferencia de puntos (DORA)

45 Se utilizó un ensayo de reasociación por transferencia de puntos para mostrar la asociación de componente secretor inmovilizado con IgA o IgM derivado de plasma *in vitro*. En resumen, tal como se muestra en la Figura 3A, el componente secretor se punteó en membranas de transferencia; se bloquearon sitios de unión no específicos. Después, se aplicaron la IgA (Figura 3B) o IgM (Figura 3C) derivada de plasma obtenida por cromatografía de afinidad a partir de plasma (carril 4), de pasta resolubilizada (carril 5) o de fracción de separación de AIEX (carril 6) obtenido tal como se ha descrito en 1.1 y 1.2 a la membrana. Después de eliminar mediante lavado la IgA o IgM no unida, se detectó la IgA/IgM unida tal como se describe brevemente más adelante.

55 Se llevó a cabo un DORA esencialmente tal como se ha descrito (Rindisbacher, L. *et al* (1995) *J. Biol. Chem.* 270:14220-14228), con las siguientes modificaciones: las membranas de transferencia estaban constituidas por polímero de fluoruro de polivinilidona (PVDF), la solución de bloqueo era solución salina tamponada con fosfato-0.05% de Tween-20 (PBS-T) que contiene un 1% de seroalbúmina bovina (BSA), se utilizaron preparados crudos enriquecidos en IgA para la incubación de recubrimiento en 200 µL de PBS-T que contiene un 0.1% de BSA, y se acoplaron directamente a HRP anticuerpos de detección.

Los resultados para IgA se muestran en la Figura 3B. El componente secretor inmovilizado fue capaz de capturar IgA derivada de plasma. De forma similar a lo que se muestra en la Figura 2C, esto demuestra que recSC se asoció con dímeros de IgA derivados de plasma.

5 Los resultados para IgM se muestran en la Figura 3C. El componente secretor inmovilizado fue capaz de capturar IgM derivada de plasma. Esto demuestra que recSC se asoció con IgM derivada de plasma.

Ejemplo 3: Digestión de IgA de tipo secretor e IgM de tipo secretor con lavados intestinales

10 Con el fin de demostrar una ventaja funcional de la asociación del componente secretor purificado con IgA e IgM que contienen cadenas J, respectivamente, se prepararon IgA e IgM tal como se ha descrito en el párrafo 1.1 y 1.2. La IgA de tipo secretor se obtuvo enriqueciendo IgA que contenía cadenas J utilizando cromatografía de exclusión por tamaños y combinando *in vitro* 10 µg de esta con 2.5 µg de componente secretor humano recombinante (hSCrec). Se obtuvo IgM de tipo secretor enriqueciendo IgM pentamérica utilizando cromatografía de exclusión por tamaños y combinando *in vitro* 25 µg de este con 2.5 µg de componente secretor humano recombinante (hSCrec). La asociación se llevó a cabo en PBS durante 30 min a temperatura ambiente tal como se ha descrito previamente (Crottet, P., y Corthésy, B. (1998) *J. Immunol.* 161:5445-5453). La integridad y el ensamblaje adecuado de las moléculas en complejos posiblemente covalentes se examinó por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras, seguida de transferencia de Western e inmunodetección con antisuero específico para hSC tal como se ha indicado anteriormente.

20 La recolección de lavados intestinales de ratones BALB/c (4-6 semanas de edad) se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento publicado (Crottet, P., y Corthésy, B. (1998) *J. Immunol.* 161:5445-5453). Para la digestión *in vitro*, se mezclaron (o no) 120 ng de IgA que contiene cadenas J purificada e IgA de tipo secretor reconstituida con 1 o 2 µL de lavados intestinales en un volumen final de 20 µL de PBS y se incubaron a 37 °C durante varios periodos de tiempo tal como se indica en la Figura 4 (T = tiempo en horas). Para la digestión *in vitro* de IgM, se mezclaron 250 ng de IgM purificada e IgM de tipo secretor con 4 µL de lavados intestinales. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 2 µL de mezcla de inhibidores de proteasas Complete™ (Roche Applied Science, Rotkreuz, Suiza), y se mantuvo congelado hasta su análisis mediante transferencia de Western que detectaba la forma reducida de cadena pesada del anticuerpo.

30 Los resultados se muestran en la Figura 4A y B. La IgA procedente de pasta resolubilizada y procedente de la separación en columna obtenida tal como se ha descrito en el apartado 1.1 e IgM de la separación en columna tal como se ha descrito en el apartado 1.2 se utilizaron cada uno como tal o ambos después de la asociación con recSC para formar IgA de tipo secretor (Fig. 4A) o IgM de tipo secretor (Fig. 4B). Para IgA, después de 4 horas de digestión con enzimas intestinales, la señal de IgA no asociada comenzó a disminuir, indicativo de digestión proteolítica; el efecto fue más intenso después de 6 horas y después de una digestión durante la noche, no se detectó cadena alfa de IgA intacta mediante transferencia de Western. Por el contrario, la IgA de tipo secretor fue mucho menos sensible a la digestión por proteasas intestinales e incluso después de la exposición durante la noche una parte significativa de la cadena alfa de IgA dentro de la IgA de tipo secretor permaneció intacta.

35 Para IgM (Fig. 4B), se muestra una comparación de IgM e IgM de tipo secretor recién asociada (SIgM) con los mismos preparados después de 24 h y 48 h de digestión. La aparición de fragmentos de cadena mu degradada tuvo lugar más rápida y más extensivamente para IgM en comparación con SIgM, lo que confirma para la IgM, de forma similar que para IgA, que la asociación con recSC proporcionó una estabilidad estructural mejorada.

40 Globalmente, esto demuestra que la asociación específica con recSC proporcionó una estabilidad estructural mejorada, y hará que las moléculas de IgA de plasma proclives a la digestión sean adecuadas para la aplicación a las mucosas, por ejemplo, mediante la vía oral.

Ejemplo 4: *Shigella flexneri*

45 Se sembró la línea celular Caco-2 epitelial de adenocarcinoma de colon humano (Colección de tejidos tipo americana) en filtros Snapwell de poliéster (diámetro, 12 mm; tamaño de poro, 0.4 µm; Corning Costar) tal como se ha descrito (Crottet, S., Corthésy-Theulaz, I., Spertini, F., y Corthésy, B. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:33978-33986). La integridad de la monocapa de células Caco-2 polarizadas se comprobó midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TER) utilizando un dispositivo Millicell-ERS (Millipore). Los valores de TER de monocapas bien diferenciadas oscilaron entre 450-550 Ω x cm².

50 Se mezclaron 2 x 10⁷ bacterias (Phalipon A. *et al* (1995) *J. Exp. Med.* 182:769-778) con 100 µg de IgA, 125 µg de IgA de tipo secretor, 275 µg de IgM o 300 µg de SIgM en un volumen final de 500 µL de DMEM puro (P-DMEM: DMEM complementado con HEPES 10 mM, 20 µg/mL de transferrina, glutamina 2 mM, 1% de aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM) y se incubaron durante 1 h a TA con agitación suave. Las mezclas se resuspendieron en P-DMEM para infectar monocapas de células Caco-2 polarizadas.

55 1 h antes del uso de las monocapas de células Caco-2 polarizadas, se reemplazó el C-DMEM por P-DMEM tanto en el compartimento apical como basolateral. A continuación, el medio apical se reemplazó por 500 µL de suspensiones

bacterianas (2×10^7 bacterias) como tales o en combinación con el anticuerpo. Los valores de TER se midieron en puntos temporales seleccionados desde el comienzo de la infección en adelante.

5 Para cuantificar las bacterias que se habían adherido a las células y las habían infectado, las células Caco-2 en los filtros se lavaron tres veces con PBS, las células se incubaron en 500 μ L de tampón de lisis frío [Tris-HCl 10 mM (pH 7), 0.2% de Nonidet P-40, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM (pH 8)] durante 5 min en hielo y se sometieron a lisis pipeteando hacia arriba y hacia abajo. Se aplicaron diluciones en serie (10^{-2} - 10^{-6}) de los lisados celulares a placas de agar LB y después de 24 h de incubación a 37 °C, se determinaron unidades formadoras de colonias (UFC) mediante recuento ocular de placas por duplicado.

10 Para examinar la integridad de las monocapas de células Caco-2, los Snapwell se lavaron con PBS, antes de la fijación durante la noche con 5 mL de paraformaldehído al 4% a 4 °C. Después de lavar con PBS, los filtros se permeabilizaron y se bloquearon los sitios de unión no específicos utilizando PBS que contenía un 5% de FCS y un 0.2% de Tritón X-100 (PBS-Tr) durante 30 min a TA. Todos los anticuerpos se diluyeron en PBS-Tr. Los filtros se incubaron con ZO-1 antihumano de ratón (1/200, Invitrogen) durante 2 h a TA, se lavaron en PBS, seguido por IgG anticonejo de cabra conjugado con Alexa Fluor® 647 (1/100, Invitrogen) durante 90 min a TA. Para visualizar las células, los filtros se incubaron finalmente con 100 ng/mL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en PBS (Invitrogen) durante 30 min. Los filtros se cortaron para retirarlos de sus soportes y se montaron en solución de Vectashield para su observación utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 710 Meta (Carl Zeiss, Alemania) equipado con un objetivo de 10x o un objetivo de 40x. Las imágenes se procesaron utilizando el software ligero Zeiss ZEN 2009.

20 Para examinar los complejos de *Shigella*-IgA, se utilizaron bacterias que expresaban la proteína fluorescente verde de forma constitutiva y se verificó la formación de complejos inmunitarios después de la incubación con anti-IgA1/IgA2 humana de ratón biotinilado (1/10 BD) durante 30 min a TA con agitación suave, seguido de estreptavidina conjugada en posición 5 con cianina (1/400, GE HealthCare) durante 30 min a TA con agitación suave. Se llevaron a cabo tres lavados con PBS entre cada paso y todos los anticuerpos se diluyeron en PBS/5% de FCS. Se colocaron los complejos inmunitarios marcados sobre portaobjetos de vidrio (Thermo Scientific), se montaron y se visualizaron inmediatamente utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 710 Meta (Carl Zeiss, Alemania) equipado con un objetivo 63x. Las imágenes se procesaron con el software ligero Zeiss ZEN 2009.

25 Se cuantificaron CXCL8 (IL-8), TNF- α y CCL3 (MIP-3 α) humanos en el compartimento basolateral de monocapas de células Caco-2 polarizadas mediante ELISA con kits comerciales (BD Biosciences y R&D Systems, respectivamente).

30 Resultados

La exposición de la monocapa de células epiteliales intestinales polarizadas a *Shigella* dio lugar a la alteración de la integridad de la monocapa, evidenciada por una disminución de la TER (Figura 5A), la invasión masiva, evidenciada por recuentos bacterianos elevados encontrados en asociación con las células epiteliales (Figura 5B), y por una monocapa de células visiblemente comprometida tal como se observa mediante microscopía confocal de barrido láser. La adición de IgA de tipo secretor retrasó e inhibió parcialmente la destrucción de la monocapa, indicada por una inhibición significativa de la reducción de la TER (Figura 5A), por una reducción en el número de bacterias unidas a células epiteliales (Figura 5B), y por una integridad de la monocapa de células más preservada en el análisis mediante microscopía confocal.

40 La asociación de SIgA monoclonal específico para *Shigella* SIgAC5, IgA polimérica e IgA de tipo secretor dio como resultado la formación de agregados inmunitarios (Figura 6) de múltiples bacterias, al contrario que la IgA e IgG monoméricas que recubrieron la bacteria solamente (Figura 6). Es probable que la agregación bacteriana por parte de mAb específicos y pIgA derivado de plasma e IgA de tipo secretor contribuya a la reducción de la adhesión bacteriana a las células Caco-2 observadas en la Figura 5B. Los mismos preparados de tres anticuerpos redujeron notablemente la producción de citocinas/quimiocinas proinflamatorias por parte de las células Caco-2, mientras que la IgAF4 e IgG monoméricas tuvieron efectos nulos (TNF- α y CCL3) o débiles (CXCL8) (Figura 7). Esto indica que la neutralización de *Shigella* por IgA secretora y polimérica disminuye la capacidad de respuesta de las células Caco-2, lo que en última instancia contribuye a las propiedades antiinflamatorias globales de IgA.

50 La protección de la monocapa de células Caco-2 polarizadas frente a la infección con *Shigella* se logró de forma similar con IgM e IgM de tipo secretor, hasta un nivel al menos similar al recuperado al utilizar SIgAC5 específicos (Figura 8). El mantenimiento de la TER durante al menos 12 h 30 indicó que el isotipo de IgM posee propiedades neutralizadoras que protegen la monocapa de Caco-2 de los daños inducidos por la exposición a *Shigella*.

Ejemplo 5: Prevención de la reparación de la infección con *Clostridium difficile* (CDI)

La composición de la invención se utiliza en un modelo de ratón de infección con *Clostridium difficile*.

55 Los ratones C57BL/6 se tratan con una mezcla de antibióticos orales (kanamicina, gentamicina, colistina, metronidazol y vancomicina) durante 3 días tal como se ha descrito previamente (Chen X, *et al. Gastroenterology* 2008, Dic.; 135(6): 1984-92). Dos días más tarde, se les proporciona fosfato de clindamicina parenteral (10 mg/kg s.c.) [Día - 1]. Un día más tarde [Día 0], se estimulan mediante una sonda con 0.5×10^5 ufc de la cepa 10465 de *C.*

difficile toxinogénica. Una colitis de moderada a fulminante se desarrolla de 1 a 5 días después de la administración de *C. difficile*. Si no se trata, esta progresa rápidamente a una colitis grave y fatal en la mayoría de los animales. Para tratar la infección primaria, los animales reciben vancomicina, durante 5 días después de la estimulación con *C. difficile*, y se monitoriza la mortalidad en los animales, así como la presencia o ausencia de CDI grave con diarrea. Los animales que se considera que se encuentran en un estado moribundo se sacrifican con una única inyección de pentobarbital sódico. Con el fin de estudiar la reaparición de CDI, los animales que sobreviven la estimulación con *C. difficile* primaria se mantienen en observación hasta el día 28. Los animales se pesan 3 veces semanalmente desde el día 7 al 28. Después de cesar el tratamiento con vancomicina, los animales reciben IgA o IgA de tipo secretor (400 mg/kg de peso corporal a través de la vía oral) durante 5 días comenzando el día después de la última dosis de vancomicina.

Resultado

Los animales tratados con vancomicina sobreviven a la infección primaria con *C. difficile*. Sin embargo, una proporción significativa de animales, hasta un 70%, sucumben a la reaparición de la infección con *C. difficile* en 3-4 días después de la terminación del tratamiento con vancomicina. Por el contrario, la reaparición de la infección se previene si los animales se tratan con IgA de tipo secretor mediante la vía oral. La IgA plasmática sola no es eficaz (o al menos no tan eficaz) como una IgA de tipo secretor en la prevención de la reaparición de la infección con *C. difficile*.

Como alternativa, la composición se utiliza en un modelo de mucositis oral similar al descrito en Watkins *et al* (*Oral Dis* 2010, 16:655-660).

Los preparados de IgA formulados apropiadamente (o solución de vehículo para el control) se proporcionan de forma profiláctica (por ejemplo, comenzando el día -3) tres veces al día a hámsters Syrian Golden durante toda la duración del estudio hasta el día 28. En un modelo de mucositis inducida por radiación aguda, en el día 0 se irradia una bolsa de la mejilla bucal evertida (40 Gy), la otra bolsa de la mejilla se deja sin tratar a modo de control. Como alternativa, en un modelo de mucositis inducida por radiación fraccionada, se aplica una dosis acumulativa de 60 Gy, se repartió en ocho fracciones de 7.5 Gy tal como se describe en (Watkins, *Oral Dis* 2010, 16:655-660). En otro modelo más de cisplatino y mucositis inducida por radiación combinados, la enfermedad se induce mediante una combinación de cisplatino (5 mg/kg) y una radiación de 35 Gy en el día 0. La evaluación clínica de la mucositis oral y la monitorización del peso corporal se lleva a cabo diariamente, comenzando el Día 6 hasta el final del estudio, habitualmente en el Día 28. El sistema de puntuación se describe en (Watkins *Oral Dis*, 2010, 16:655-660). Además, las muestras de tejido y plasma se recogen y se procesan apropiadamente a lo largo del estudio para análisis histológicos, determinación de marcadores inflamatorios en el plasma y para estudios de expresión génica de varios tejidos.

Resultados

Un animal tratado con vehículo/no tratado desarrolla mucositis oral, la enfermedad alcanza su máximo alrededor del día 16-18, una curación espontánea, evidenciada por una regresión de la mucositis, comienza alrededor del día 18-20. Los animales tratados con IgA y en particular con IgA de tipo secretor tiene puntuaciones de mucositis significativamente inferiores en comparación con los animales de control y pierden menos peso, aparejado con hallazgos histológicos menos graves y niveles reducidos de marcadores inflamatorios (incluidos, sin carácter limitante, citocinas y quimiocinas inflamatorias). La reducción de la inflamación y la estimulación de la curación de heridas se confirma al nivel de la expresión de ARNm mediante técnicas de análisis de expresión génica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CSL Behring AG
 <120> Composiciones
 <130> A192
 <150>EP2012158931.1
 < 151>2012-03-09
 <150>EP2012168343
 < 151>2012-05-16
 <160> 1
 <170> PatentIn versión 3.3

ES 2 751 976 T3

<210>1
 <211>764
 <212>PRT
 < 213>Homo sapiens

5 <400>1
 Met Leu Leu Phe Val Leu Thr Cys Leu Leu Ala Val Phe Pro Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Thr Lys Ser Pro Ile Phe Gly Pro Glu Glu Val Asn Ser Val Glu
 20 25 30
 Gly Asn Ser Val Ser Ile Thr Cys Tyr Tyr Pro Pro Thr Ser Val Asn
 35 40 45
 Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp Cys Arg Gln Gly Ala Arg Gly Gly Cys
 50 55 60
 Ile Thr Leu Ile Ser Ser Glu Gly Tyr Val Ser Ser Lys Tyr Ala Gly
 65 70 75 80
 Arg Ala Asn Leu Thr Asn Phe Pro Glu Asn Gly Thr Phe Val Val Asn
 85 90 95
 Ile Ala Gln Leu Ser Gln Asp Asp Ser Gly Arg Tyr Lys Cys Gly Leu
 100 105 110
 Gly Ile Asn Ser Arg Gly Leu Ser Phe Asp Val Ser Leu Glu Val Ser
 115 120 125
 Gln Gly Pro Gly Leu Leu Asn Asp Thr Lys Val Tyr Thr Val Asp Leu
 130 135 140
 Gly Arg Thr Val Thr Ile Asn Cys Pro Phe Lys Thr Glu Asn Ala Gln
 145 150 155 160

ES 2 751 976 T3

Lys Arg Lys Ser Leu Tyr Lys Gln Ile Gly Leu Tyr Pro Val Leu Val
 165 170 175
 Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Val Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Arg Ile Arg
 180 185 190
 Leu Asp Ile Gln Gly Thr Gly Gln Leu Leu Phe Ser Val Val Ile Asn
 195 200 205
 Gln Leu Arg Leu Ser Asp Ala Gly Gln Tyr Leu Cys Gln Ala Gly Asp
 210 215 220
 Asp Ser Asn Ser Asn Lys Lys Asn Ala Asp Leu Gln Val Leu Lys Pro
 225 230 235 240
 Glu Pro Glu Leu Val Tyr Glu Asp Leu Arg Gly Ser Val Thr Phe His
 245 250 255
 Cys Ala Leu Gly Pro Glu Val Ala Asn Val Ala Lys Phe Leu Cys Arg
 260 265 270
 Gln Ser Ser Gly Glu Asn Cys Asp Val Val Val Asn Thr Leu Gly Lys
 275 280 285
 Arg Ala Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ile Leu Leu Asn Pro Gln Asp Lys
 290 295 300
 Asp Gly Ser Phe Ser Val Val Ile Thr Gly Leu Arg Lys Glu Asp Ala
 305 310 315 320
 Gly Arg Tyr Leu Cys Gly Ala His Ser Asp Gly Gln Leu Gln Glu Gly
 325 330 335
 Ser Pro Ile Gln Ala Trp Gln Leu Phe Val Asn Glu Glu Ser Thr Ile
 340 345 350
 Pro Arg Ser Pro Thr Val Val Lys Gly Val Ala Gly Gly Ser Val Ala
 355 360 365
 Val Leu Cys Pro Tyr Asn Arg Lys Glu Ser Lys Ser Ile Lys Tyr Trp
 370 375 380
 Cys Leu Trp Glu Gly Ala Gln Asn Gly Arg Cys Pro Leu Leu Val Asp
 385 390 395 400
 Ser Glu Gly Trp Val Lys Ala Gln Tyr Glu Gly Arg Leu Ser Leu Leu

ES 2 751 976 T3

Ala Val Gly Val Ala Arg Ala Arg His Arg Lys Asn Val Asp Arg Val
660 665 670

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para producir una composición que comprende IgA de tipo secretor y/o IgM de tipo secretor que comprende los pasos de
 - 5 (a) obtener una composición de proteínas derivadas de la sangre que comprende inmunoglobulina que contiene cadenas J,
 - (b) mezclar la composición del paso (a) con un componente secretor,
- donde no se lleva a cabo ningún paso de purificación diseñado específicamente para separar IgA dimérica que contiene cadenas J o polímeros de otras proteínas, como cromatografía de afinidad o exclusión por tamaños y selección de la fracción de la masa molecular relevante, para obtener la composición del paso (a).
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde la composición comprende IgA de tipo secretor.
 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la composición del paso (a) contiene al menos un 5% de IgA unida a cadenas J.
 - 15 4. El método de la reivindicación 3, donde la composición del paso (a) contiene al menos un 10% de IgA unida a cadenas J.
 5. El método de la reivindicación 3, donde la composición del paso (a) contiene al menos un 20% de IgA unida a cadenas J.
 6. El método de la reivindicación 3, donde la composición del paso (a) contiene al menos un 30% de IgA unida a cadenas J.
 - 20 7. El método de la reivindicación 3, donde la composición del paso (a) contiene al menos un 50% de IgA unida a cadenas J.
 8. El método de cualquier reivindicación anterior, donde la composición del paso (a) se obtiene a partir de sangre humana.
 - 25 9. El método de cualquier reivindicación anterior, donde el componente secretor en el paso (b) es componente secretor recombinante.
 10. El método de cualquier reivindicación anterior, donde el componente secretor es componente secretor humano.
 11. El método de cualquier reivindicación anterior, donde el componente secretor se produce en una línea celular de mamífero.
 - 30 12. El método de cualquier reivindicación anterior, donde el componente secretor es la parte extracelular del receptor de inmunoglobulina polimérica plgR.
 13. El método de cualquier reivindicación anterior, donde en el paso (b) la proporción molar entre componente secretor añadido y cadena J dentro de los dímeros/polímeros de IgA oscila entre 1:10 y 10:1.
 14. El método de la reivindicación 13, donde la proporción oscila entre 1:5 y 5:1.
 - 35 15. El método de la reivindicación 14, donde la proporción oscila entre 1:2 y 2:1.
 16. Una composición que comprende IgA de tipo secretor y/o IgM de tipo secretor o una combinación de estos que se puede obtener mediante un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
 17. La composición de la reivindicación 16, que comprende además un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
 - 40 18. La composición de la reivindicación 16 o la reivindicación 17 para su uso en medicina.

Figura 1

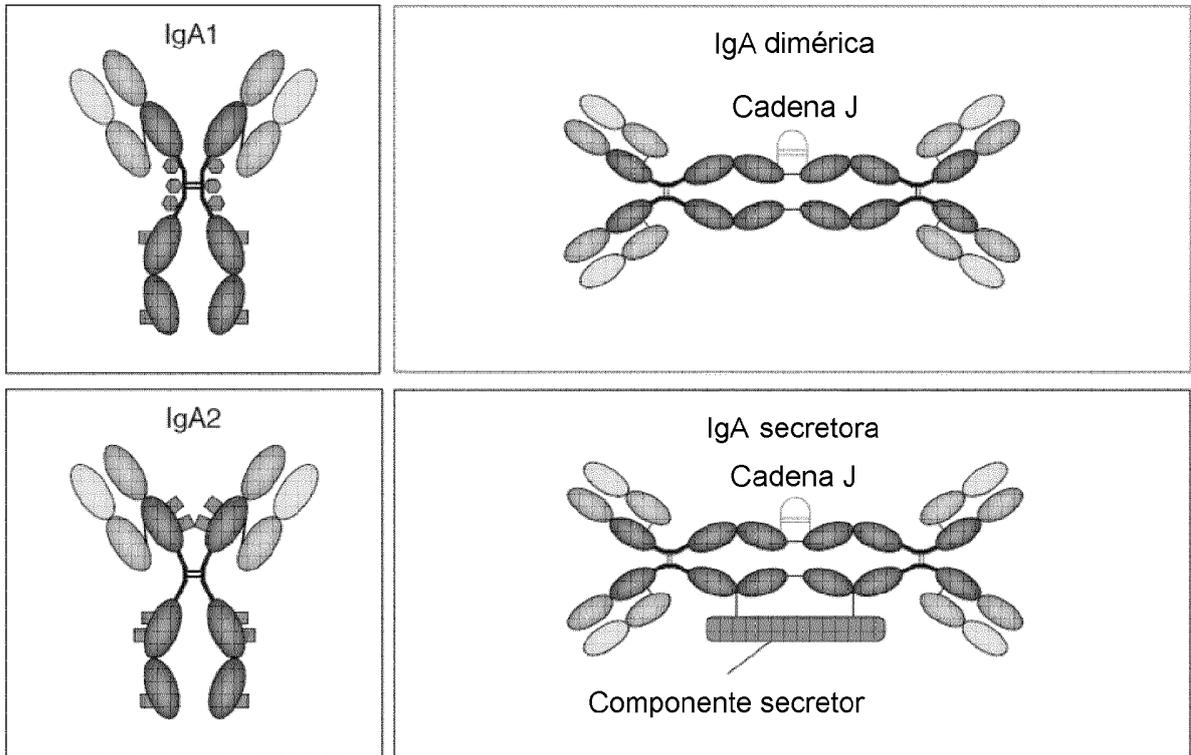


Figura 2A

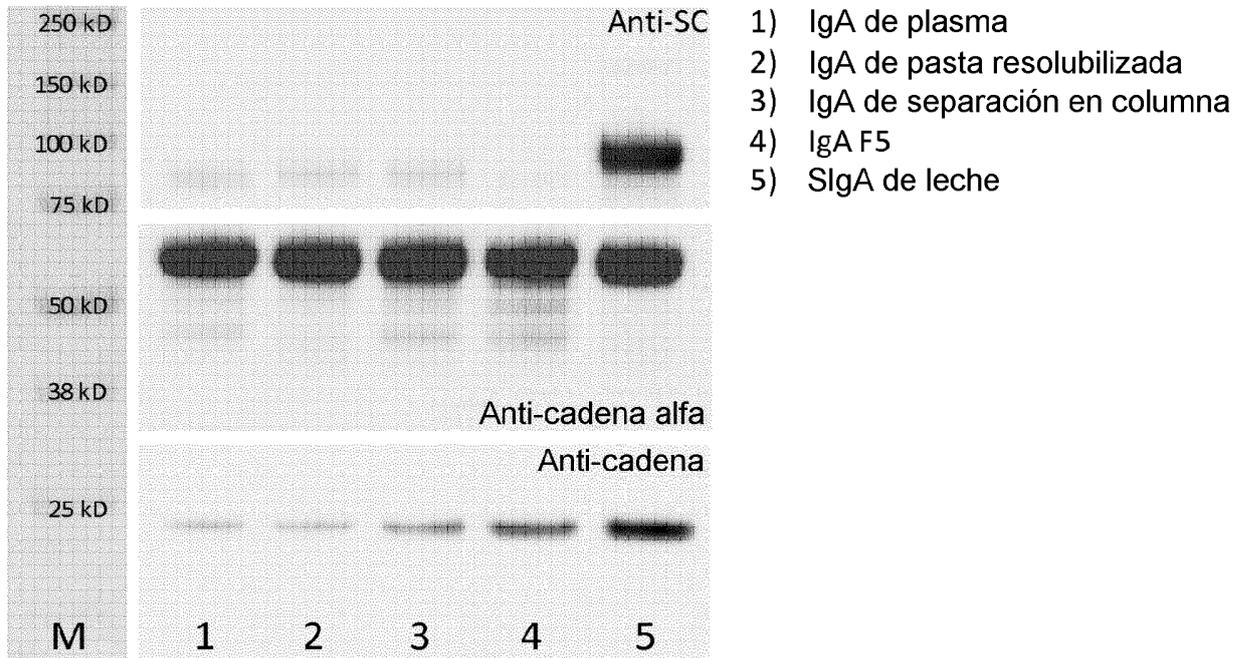


Figura 2B

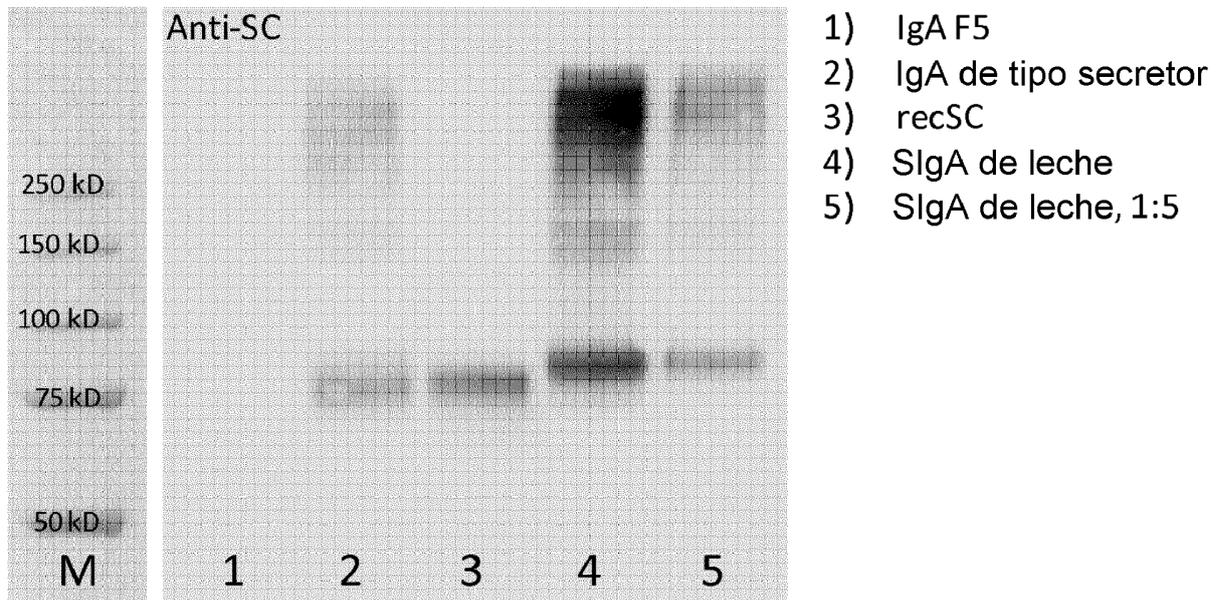
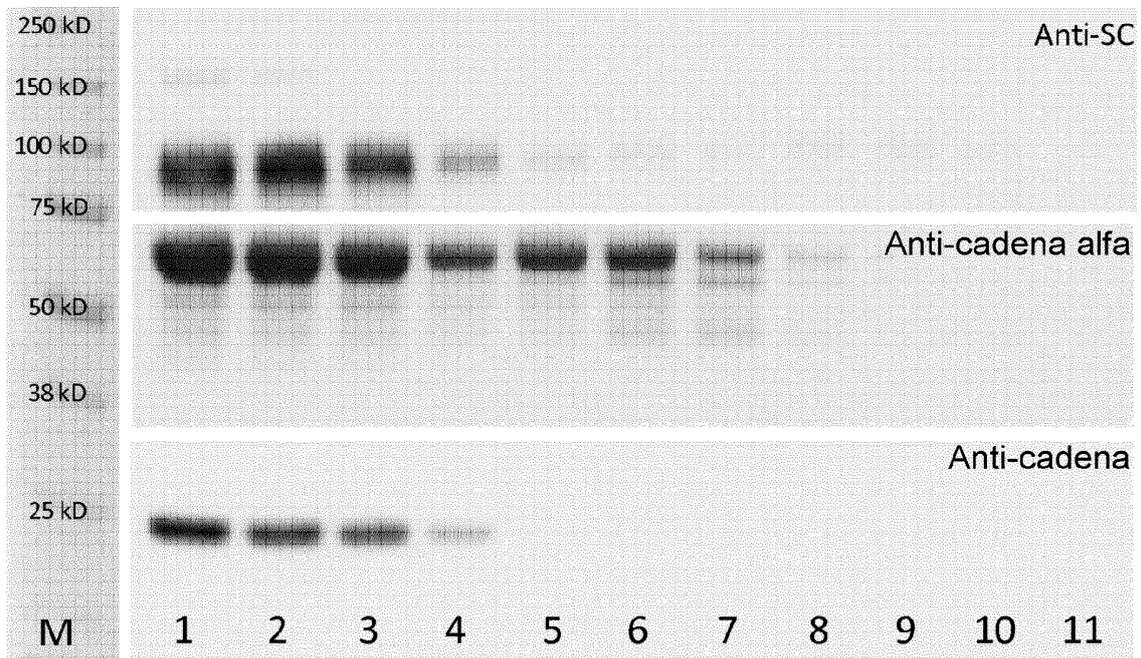


Figura 2C



- | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| 1) Fracción de SEC 8.0-8.5 min | 7) Fracción de SEC 11.0-11.5 min |
| 2) Fracción de SEC 8.5-9.0 min | 8) Fracción de SEC 11.5-12.0 min |
| 3) Fracción de SEC 9.0-9.5 min | 9) Fracción de SEC 12.0-12.5 min |
| 4) Fracción de SEC 9.5-10.0 min | 10) Fracción de SEC 12.5-13.0 min |
| 5) Fracción de SEC 10.0-10.5 min | 11) Fracción de SEC 13.0-13.5 min |
| 6) Fracción de SEC 10.5-11.0 min | |

Figura 2D

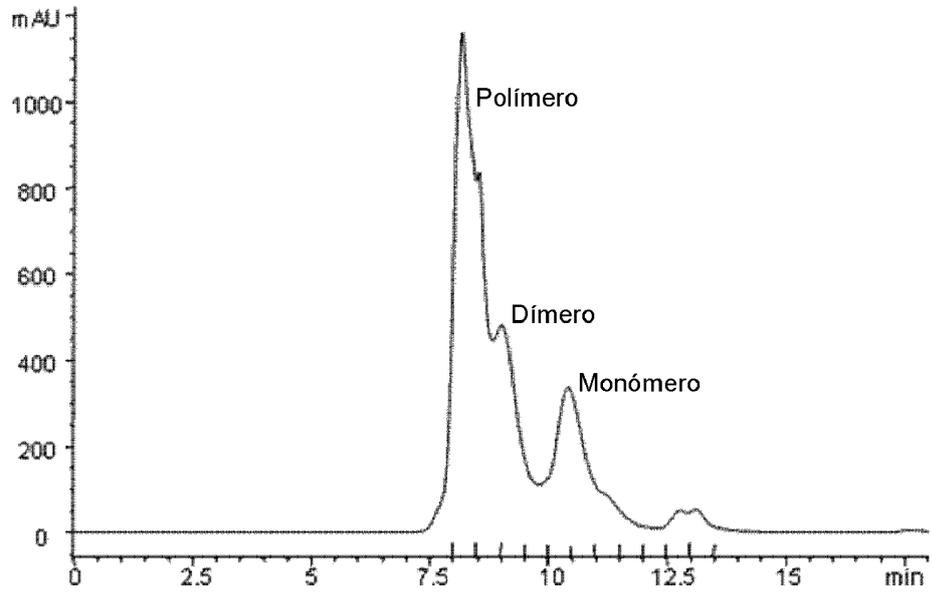
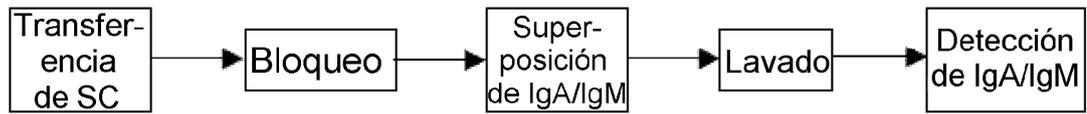


Figura 3

A



B

SC	-	+	+	+	+	+
IgA	+	-	+	+	+	+
Anti-IgA	+	+	-	+	+	+

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

C

SC	-	+	+	+	+	+
IgM	+	-	+	+	+	+
Anti-IgM	+	+	-	+	+	+

7	8	9	10	11	12
---	---	---	----	----	----

Figura 4A

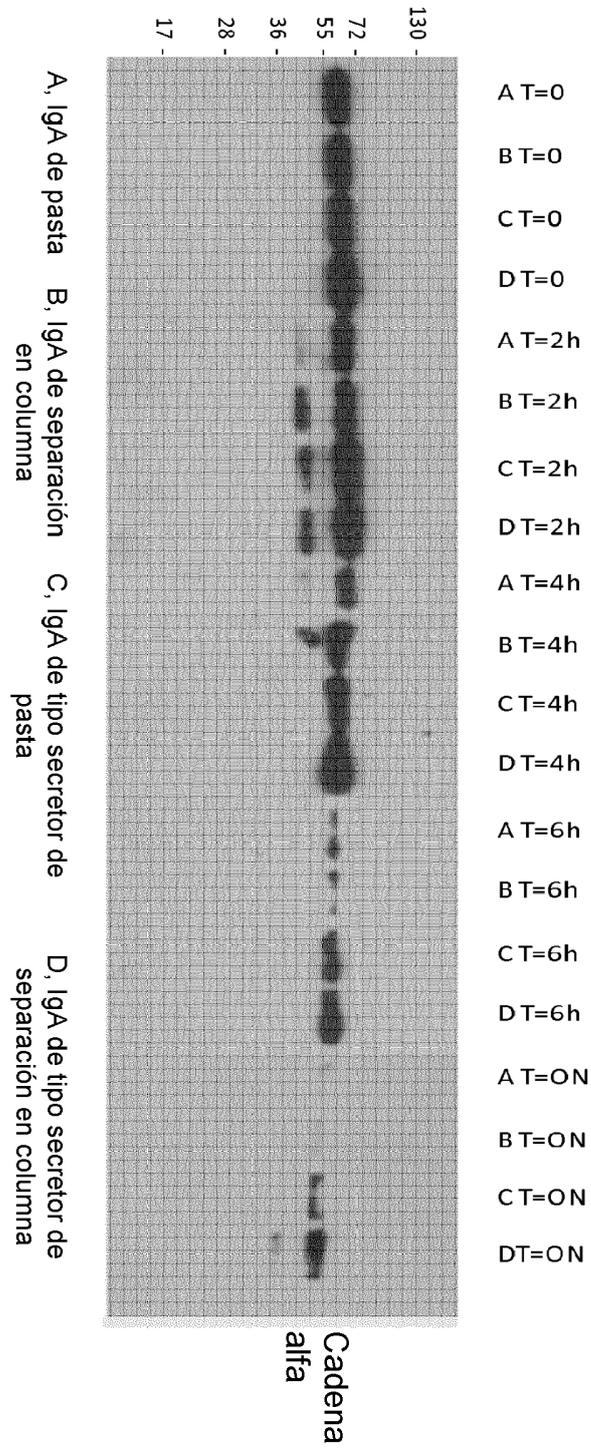


Figura 4B

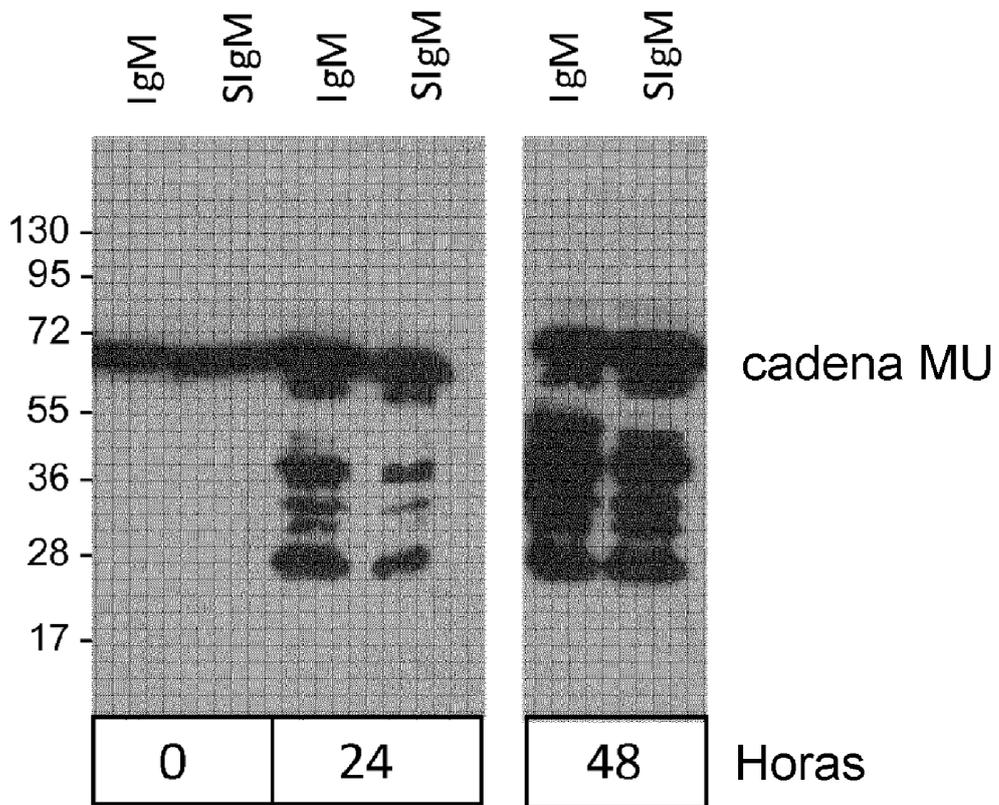


Figura 5A

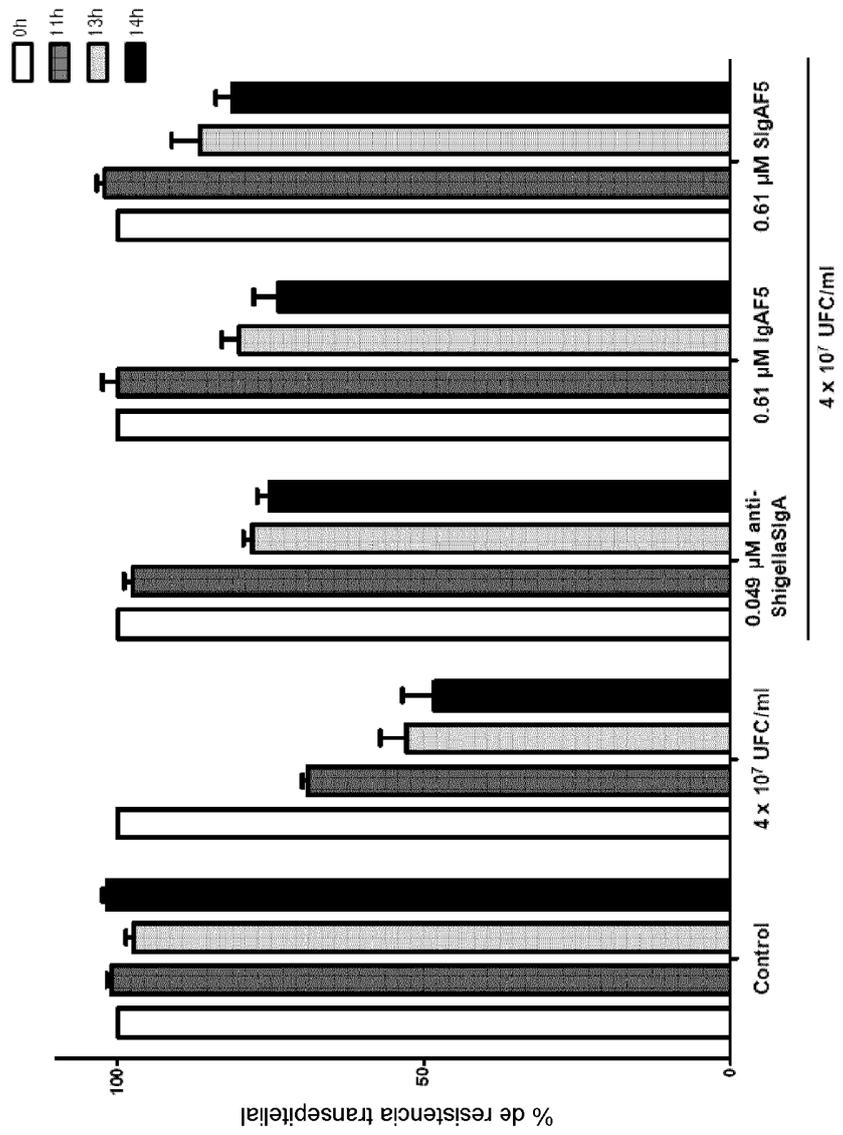


Figura 5B

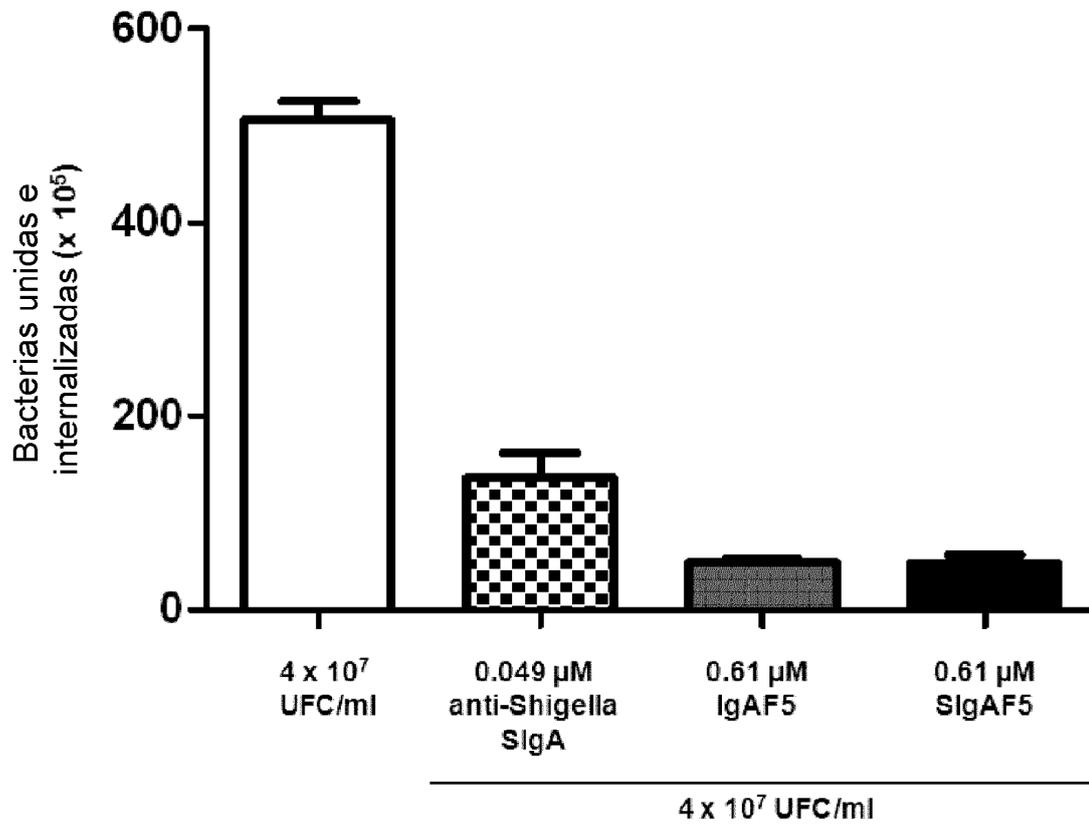


Figura 6

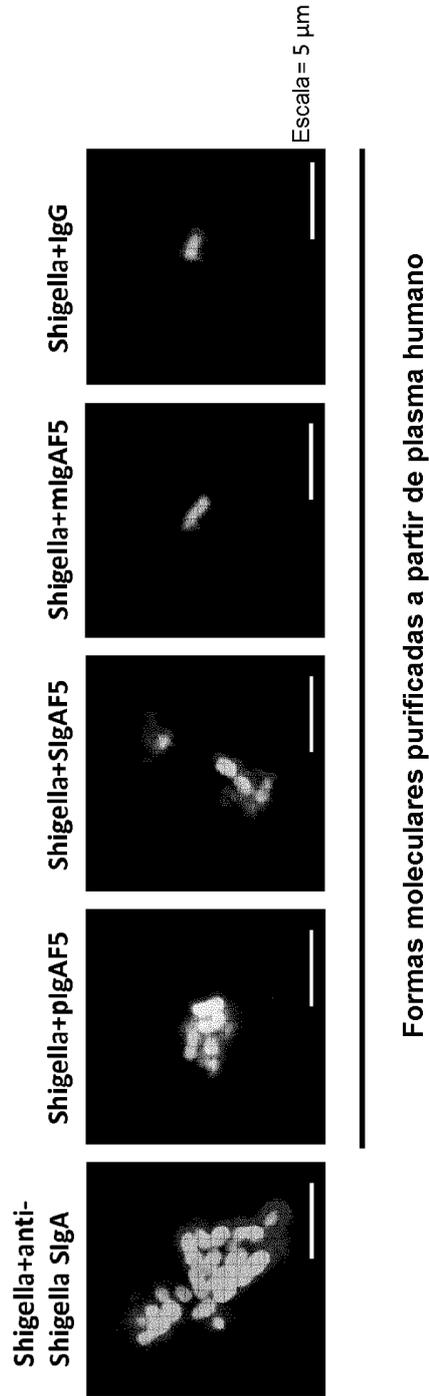


Figura 7

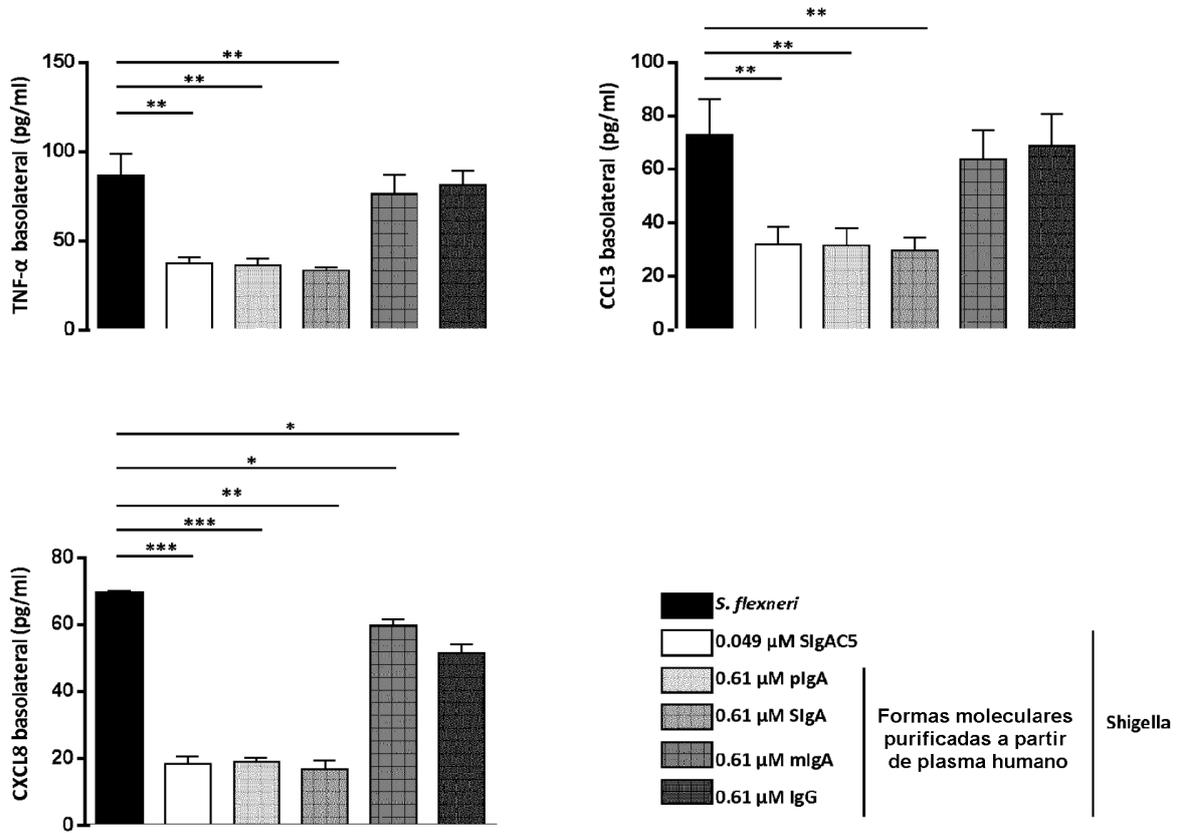


Figura 8

