

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 110**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/744** (2015.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 35/745** (2015.01)  
**A61K 35/747** (2015.01)  
**A61K 9/14** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61P 37/08** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 16/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2019 PCT/KR2019/000524**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2019 WO19139434**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2019 E 19738433 (2)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023 EP 3738599**

54 Título: **Composición que comprende probióticos y polipéptidos que tienen afinidad de unión por IgE y uso de la misma**

30 Prioridad:

**12.01.2018 KR 20180004421**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.05.2024**

73 Titular/es:

**GI INNOVATION, INC. (100.0%)  
A-1116, 167, Songpa-daero, Songpa-gu  
Seoul 05855, KR**

72 Inventor/es:

**JANG, MYOUNG HO;  
SUNG, YOUNG CHUL y  
YANG, ZUNGYOON**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 969 110 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

Composición que comprende probióticos y polipéptidos que tienen afinidad de unión por IgE y uso de la misma

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición, y a dicha composición para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica, a un alimento funcional para la salud para su uso en la mejora o alivio de un síntoma alérgico, y a un kit para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica.

Antecedentes de la técnica

10 La alergia alimentaria es una enfermedad causada por una disminución de la resistencia inmunológica frente a antígenos alimentarios no patógenos (alérgenos). La enfermedad puede ocasionar un deterioro de la calidad de vida debido a restricciones en la dieta y puede poner en peligro la vida en caso de que se desarrolle anafilaxia aguda y crónica. Las enfermedades alérgicas tales como la rinitis alérgica y la dermatitis atópica, así como las alergias alimentarias, se están propagando a un ritmo elevado en las sociedades modernas industrializadas y occidentalizadas. Además, también está aumentando el desarrollo de anafilaxia, una reacción alérgica grave. Estas enfermedades inmunitarias perjudican gravemente la calidad de vida y, de acuerdo con lo anterior, los costes socioeconómicos se están disparando. De este modo, existe una apremiante necesidad de medidas para superar estas enfermedades.

15 Aunque las enfermedades de alergias alimentarias pueden desarrollarse mediante una respuesta inmunitaria mediada o no mediada por IgE, la alergia alimentaria mediada por IgE es la más común. En la alergia alimentaria mediada por IgE, los alérgenos se unen a la IgE, y la IgE unida al alérgeno entrecruza FcεRI, un receptor Fc de IgE de alta afinidad en células efectoras tales como mastocitos y basófilos, induciendo así la activación de las células efectoras. En el caso de que se activen las células efectoras, se liberan moduladores, ocasionando así una hipersensibilidad inmediata. Además de las enfermedades de alergias alimentarias, la mayoría de las enfermedades alérgicas son causadas por una respuesta inmunitaria excesiva debida a la inmunoglobulina E (IgE). La IgE es un anticuerpo que normalmente está presente en el suero en una concentración muy baja. La IgE también es producida por antígenos inocuos. En el caso de que el número de IgE aumente sin ningún estímulo particular, se puede ocasionar una enfermedad alérgica. El número anormalmente aumentado de IgE puede unirse a receptores Fc de IgE de alta afinidad (FcεRI) que se expresan en la superficie de los mastocitos, basófilos y similares.

20 Esta unión entre la IgE y el receptor Fc de IgE hace que los mastocitos o basófilos liberen mediadores químicos tales como histamina, leucotrienos, prostaglandinas, bradiquinina y factores activadores de plaquetas. La liberación de estos mediadores químicos por parte de los mastocitos o basófilos produce síntomas alérgicos. En particular, se puede presentar un empeoramiento de los síntomas alérgicos en el caso de que IgE y FcεRI estén unidos entre sí. Se sabe que las células que expresan FcεRI aumentan en pacientes alérgicos.

25 Para tratar las enfermedades alérgicas se han propuesto diversos métodos, tales como la evitación de alérgenos, la administración de fármacos antialérgicos, la modulación de la síntesis de IgE en el organismo y el desarrollo de anticuerpos anti-IgE. Sin embargo, estos métodos tienen muchos inconvenientes, tales como la incapacidad de curar una causa subyacente de alergia, la eficacia insuficiente del fármaco y la aparición de efectos secundarios graves.

30 Mientras tanto, se ha estudiado un método para usar microorganismos tales como bacterias ácido lácticas con el fin de tratar o mejorar enfermedades alérgicas. Estos microorganismos saludables se denominan probióticos. Sin embargo, aún no se han establecido técnicas para descubrir y evaluar probióticos para el control inmunológico, tales como la inhibición de las alergias. En particular, los estudios sobre el mecanismo de acción subyacente de los probióticos son inadecuados y la mayoría de los estudios se realizan *in vitro*. En otras palabras, aunque los probióticos se ingieren por vía oral, la mayoría de los estudios hasta ahora se han centrado en experimentos *in vitro* usando líneas celulares, y estos métodos experimentales tienen el gran inconveniente de que no es posible proporcionar un sustituto para los estudios sobre funciones que pueden ser exhibidos en el caso de que un humano ingiera probióticos.

35 Además, se han estudiado composiciones de inmunoglobulinas para tratar enfermedades alérgicas. Se ha informado que tales composiciones son útiles para tratar trastornos mediados por IgE, incluidos alergia y asma (KR10-1783272B1). En particular, el omalizumab (nombre comercial: Xolair), que se dirige a una porción Fc de un anticuerpo IgE, se ha desarrollado y usado como agente terapéutico para el asma grave que no se puede tratar y la urticaria que no se puede tratar. Sin embargo, se requiere la administración de dosis altas del omalizumab para mantener los efectos. Por lo tanto, se ha informado que el omalizumab tiene una carga de costes elevada y efectos secundarios tales como angioedema y reacción anafiláctica (*The Journal of Clinical Investigation*, Volumen 99, Número 5, marzo de 1997, 915-925).

40 Aunque aún no se ha identificado el mecanismo subyacente por el cual el omalizumab causa efectos secundarios, se puede esperar que el omalizumab sea un anticuerpo IgG1. Un estudio dirigido a un modelo de ratón demostró que una gran cantidad de anticuerpos IgG1 específicos de antígeno puede inducir anafilaxia sistémica pasiva (PSA) mediante FcγRIII, un receptor de IgG de baja afinidad y factores activadores de plaquetas en un entorno rico en antígenos. Además, esta anafilaxia mediada por IgG ocurre de manera exagerada debido a la falta de señalización de

FcεRI. Por lo tanto, se puede producir anafilaxia sistémica pasiva en el caso de que se inyecte una cantidad considerable del omalizumab a un paciente con una enfermedad alérgica que presenta un nivel alto de IgE. Recientemente, se ha informado que FcγRIIA, un receptor de IgG de baja afinidad expresado en un ser humano, también se asocia con anafilaxia mediada por IgG. Además, los estudios posteriores a la comercialización han informado reacciones anormales como vasculitis granulomatosa alérgica y trombocitopenia idiopática intensa.

El documento KR20030082950A divulga una cepa bacteriana del grupo de bacterias ácido lácticas que expresa un polipéptido de superficie que contiene una secuencia de péptidos que imita al menos parte de un epítipo conformacional de una molécula de IgE. El documento JP 2011505349 divulga *Bifidobacterium breve* y su uso para el tratamiento de enfermedades alérgicas. El documento KR 20120116400 divulga dímeros de polipéptidos que comprenden dímeros de proteína de fusión Fc derivados de FcεRIαECD-IgG y su uso para el tratamiento de enfermedades alérgicas. El número de acceso del NCBI Genbank 1J89\_A divulga una secuencia de aminoácidos de FcεRIαECD. El documento JP 2010 513245 divulga especies de *Lactobacillus* que producen un anticuerpo que se une a una citocina y su uso para el tratamiento de enfermedades alérgicas. El documento WO 2019/135668 divulga dímeros polipeptídicos. El documento WO 2008/028068 divulga dímeros de proteína de fusión Fc derivados de FcεRIαECD-IgG.

Problema técnico

Aunque se han realizado muchos estudios sobre enfermedades alérgicas, hasta ahora no se ha desarrollado un método para mejorar drásticamente las enfermedades alérgicas. Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para tratar o prevenir tales enfermedades alérgicas.

Solución al problema

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende, como ingredientes activos, probióticos y un polipéptido con capacidad de unión a IgE, en la que el polipéptido con capacidad de unión a IgE es una proteína recombinante que es un dímero de polipéptido que contiene dos monómeros, cada uno de los cuales comprende un dominio extracelular de una subunidad alfa de un receptor Fc de IgE (FcεRIαECD),

el monómero contiene una región Fc modificada, en la que la región Fc modificada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y

la región Fc modificada y el FcεRIαECD están unidos mediante un enlazante.

En una realización, los probióticos son bacterias ácido lácticas o *Bifidobacterium*, opcionalmente en la que las bacterias ácido lácticas son cualquiera seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*.

En una realización, el *Lactobacillus* es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasserii*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus* y *L. salivarius*, el *Lactococcus* es *Lc. lactis*, y el *Streptococcus* es *S. thermophilus*.

En una realización, el *Bifidobacterium* es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* y *B. animalis ssp. lactis*.

En una realización, los probióticos son *L. casei* o *B. longum*.

En una realización, el dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En una realización, los probióticos están en forma de polvo seco.

En un segundo aspecto, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica, en la que la composición farmacéutica comprende la composición del primer aspecto como ingrediente activo.

En una realización, la enfermedad alérgica es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en alergia alimentaria, dermatitis atópica, asma, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica, urticaria idiopática crónica y dermatitis alérgica de contacto.

En un tercer aspecto, se proporciona una composición de alimento funcional para la salud para su uso en la mejora o alivio de un síntoma alérgico, en la que la composición de alimento funcional para la salud comprende la composición del primer aspecto como ingrediente activo.

En un cuarto aspecto, se proporciona un kit para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica, que comprende una primera composición que contiene probióticos y una segunda composición que contiene un polipéptido con capacidad de unión a IgE,

en la que el polipéptido con capacidad de unión a la IgE es una proteína recombinante que es un dímero de polipéptido que contiene dos monómeros,

cada uno de los cuales comprende un dominio extracelular de una subunidad alfa de un receptor Fc de IgE (FcεRIαECD),

- 5 el monómero contiene una región Fc modificada, en la que la región Fc modificada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y

la región Fc modificada y el FcεRIαECD están unidos mediante un enlazante,

en la que la segunda composición es una composición para administración subcutánea o intravenosa.

Efectos ventajosos de la invención

- 10 La composición que comprende, como ingredientes activos, probióticos y un polipéptido con capacidad de unión a IgE, exhibe un excelente efecto de mejora de la alergia in vivo. De este modo, la composición se puede usar como composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad alérgica intensa. Adicionalmente, desde el punto de vista de que la composición se puede aplicar a la inmunoterapia oral, la composición no sólo puede ser más eficaz para la alergia alimentaria al mismo tiempo que disminuye los efectos secundarios, sino que también es ideal para tratar a niños que padecen alergias mediadas por IgE. Por lo tanto, la composición se puede usar como alimento funcional saludable para la mejora o alivio de un síntoma alérgico.
- 15

Breve descripción de los dibujos

- 20 La figura 1 ilustra un diagrama esquemático de la constitución de un monómero que forma un ejemplo (IgE<sub>TRAP</sub>) del dímero de polipéptido de la presente divulgación. Un ejemplo de IgE<sub>TRAP</sub> puede consistir en 425 aminoácidos desde FcεRIα humano (región del aminoácido 26° al aminoácido 205° en el dominio extracelular de FcεRIα, 180 aa) hasta Fc híbrido IgD/IgG4 humano (245 aminoácidos). El Fc híbrido IgD/IgG4 tiene un sitio de unión a FcRn (línea rayada derecha) pero carece de sitios de unión para FcγR y C1q (línea rayada izquierda). Aquí, IgD puede ser una región (38 aa) desde el aminoácido 133° hasta el aminoácido 170°, e IgG4 puede ser una región (207 aa) desde el aminoácido 121° hasta el aminoácido 327°.

- 25 La figura 2 ilustra un modelo estructural tridimensional de un homodímero de IgE<sub>TRAP</sub>. La estructura muestra un dominio extracelular FcεRIα (azul), una bisagra IgD (amarillo) y un Fc IgG4 (verde).

La figura 3 ilustra los resultados de SDS-PAGE para polipéptidos con capacidad de unión a IgE producida en cada línea celular (Figura 3A). Aquí, se puede ver que no se genera una forma truncada tanto en condiciones reductoras como no reductoras (Figuras 3A y 3B).

- 30 La figura 4 ilustra los resultados de experimentos de enfoque isoeléctrico (GEL-IEF) realizados para identificar un aumento en el contenido de ácido siálico de polipéptidos con capacidad de unión a IgE que se han producido en cada línea celular. El contenido de proteínas con un punto isoeléctrico mayor (pI) reducido aumenta debido a un aumento en el contenido de ácido siálico cargado negativamente causado por la introducción de un gen de transferasa de ácido siálico. De esto se desprende que mediante la adición de transferasa de ácido siálico aumenta el contenido de proteínas ácidas.
- 35

La figura 5 ilustra los resultados de SDS-PAGE para formas reducidas y no reducidas de una proteína dimérica de polipéptidos (IgE<sub>TRAP</sub>) según un ejemplo de la presente divulgación. En particular, se puede ver que el dímero de polipéptido tiene una pureza elevada incluso en el sobrenadante del cultivo que corresponde a la entrada.

- 40 La figura 6 ilustra los resultados obtenidos realizando análisis SDS-PAGE de IgE<sub>TRAP</sub> en condiciones reducidas y no reducidas.

La figura 7 ilustra un gráfico que muestra la capacidad de unión del omalizumab a IgE. El gráfico muestra los resultados obtenidos inmovilizando el omalizumab y analizando su capacidad de unión en función de las concentraciones de IgE tratadas. La interacción entre la IgE humana y el omalizumab se analizó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) y se calculó la afinidad de unión de cada molécula.

- 45 La figura 8 ilustra un gráfico que muestra la capacidad de unión a IgE de la proteína dimérica de polipéptidos (IgE<sub>TRAP</sub>) según un ejemplo de la presente divulgación. El gráfico muestra los resultados obtenidos inmovilizando el IgE<sub>TRAP</sub> y analizando su capacidad de unión dependiendo de las concentraciones de IgE tratadas. La interacción entre la IgE humana y la IgE<sub>TRAP</sub> se analizó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) y se calculó la afinidad de unión de cada molécula.

- 50 Las figuras 9 a 13 ilustran los resultados obtenidos al identificar interacciones de la proteína dimérica (IgE<sub>TRAP</sub>), un ejemplo de la presente divulgación, y el omalizumab con los receptores de IgG FcγRI (Figura 9), FcγRIIA (Figura 10), FcγRIIB (Figura 11), FcγRIIIA (Figura 12) y FcγRIIIB (Figura 13) usando el ensayo de interferometría de biocapa (BLI).

- La figura 14 ilustra un gráfico obtenido cuantificando una capacidad de unión entre IgE<sub>TRAP</sub> y receptores de IgG, y entre el omalizumab y receptores de IgG.
- La figura 15A ilustra un gráfico que muestra una capacidad inhibidora, sobre la actividad de los mastocitos derivados de ratón, de la proteína dimérica de polipéptidos (IgE<sub>TRAP</sub>) según un ejemplo de la presente divulgación dependiendo de las concentraciones de los mismos.
- 5 La figura 15B ilustra un gráfico que muestra una comparación entre las capacidades inhibidoras, sobre la actividad de los mastocitos derivados de ratón que expresan FcεRI humano, de la proteína dimérica de polipéptidos (IgE<sub>TRAP</sub>) según un ejemplo de la presente divulgación y Xolair (omalizumab) dependiendo de las concentraciones de los mismos.
- La figura 16 ilustra las potencias de una proteína dimérica de polipéptidos según un ejemplo de la presente divulgación en un modelo de enfermedad inducida por alergia alimentaria.
- 10 La figura 17 ilustra un programa experimental para la inducción de alergia alimentaria e IgE<sub>TRAP</sub>, *B. longum* y terapia combinada con i.p., intraperitoneal; i.g., intragástrico
- La figura 18 ilustra las potencias de IgE<sub>TRAP</sub>, *B. longum* y terapia combinada para inhibir los síntomas de diarrea inducida por alergia n = 16 a 18 ratones por grupo, OVA frente a OVA + IgE<sub>TRAP</sub>: \*P < .05, OVA frente a OVA + *B. longum* + IgE<sub>TRAP</sub> y OVA frente a PBS: \*\*\*P < .0001
- 15 La figura 19A ilustra un plan experimental para identificar que *B. longum* mejora los efectos terapéuticos de IgE<sub>TRAP</sub>. En concreto, se muestra un plan experimental para la inducción de alergia alimentaria y la administración única o combinada de IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum*. i.p., intraperitoneal; i.g., intragástrico
- La figura 19B ilustra un gráfico obtenido identificando los efectos de la administración combinada de probióticos y la proteína dimérica de polipéptidos (IgE<sub>TRAP</sub>) con una capacidad de unión a IgE que depende de dosis aumentadas en un modelo de enfermedad inducida por alergia alimentaria. Se muestran los efectos de IgE<sub>TRAP</sub>, *B. longum* y una combinación de los mismos para inhibir la diarrea alérgica a los alimentos. n = 14 ratones por grupo, OVA frente a OVA + *B. longum* + IgE<sub>TRAP</sub> (20 μg), OVA frente a OVA + *B. longum* + IgE<sub>TRAP</sub> (200 μg) y OVA frente a PBS: \*\*P < .001
- 20 La figura 20 ilustra los resultados obtenidos analizando, con ELISA, los niveles de proteasa-1 de los mastocitos (MCPT-1) en sueros obtenidos de respectivos grupos experimentales, en el momento de la administración de IgE<sub>TRAP</sub>, *B. longum* y una combinación de los mismos, en un modelo de enfermedad inducida por alergia alimentaria.
- 25 La figura 21 ilustra los resultados obtenidos midiendo, con ELISA, los niveles de IgE total (IgE libre y complejo IgE-IgE<sub>TRAP</sub>) en sueros obtenidos de respectivos grupos experimentales, en el momento de la administración de IgE<sub>TRAP</sub>, *B. longum*, y una combinación de los mismos, en un modelo de enfermedad inducida por alergia alimentaria. n = 16 a 18 ratones por grupo, OVA frente a OVA + IgE<sub>TRAP</sub>, OVA frente a OVA + *B. longum* + IgE<sub>TRAP</sub> y OVA frente a PBS: \*\*\*P < .0001
- 30 La figura 22 ilustra los resultados obtenidos midiendo, con ELISA, los niveles de IgE libre en sueros obtenidos de los respectivos grupos experimentales, en el momento de la administración de IgE<sub>TRAP</sub>, *B. longum* y una combinación de los mismos, en un modelo de enfermedad inducida por alergia alimentaria. n = 16 a 18 ratones por grupo, OVA frente a OVA + IgE<sub>TRAP</sub>, OVA frente a OVA + *B. longum* + IgE<sub>TRAP</sub> y OVA frente a PBS: \*\*\*P < .0001
- 35 La figura 23 ilustra los resultados obtenidos al identificar efectos inhibidores sobre la proliferación de los mastocitos y la proliferación de células caliciformes en respectivos grupos experimentales, en el momento de la administración de IgE<sub>TRAP</sub>, *B. longum* y una combinación de los mismos, en un modelo de enfermedad inducida por alergia alimentaria. Se muestran los resultados obtenidos mediante la tinción de mastocitos (rojo) en secciones representativas de parafina del yeyuno en los respectivos grupos experimentales (aumento 400x). El agrandamiento del yeyuno muestra claramente los mastocitos (rojo).
- 40 La figura 24 ilustra los resultados obtenidos ampliando los mastocitos 400 veces en la figura 23 e identificar los mastocitos. n = 10 a 12 ratones por grupo, OVA frente a *B. longum* y OVA frente a IgE<sub>TRAP</sub>: \*\*\*P < .001, OVA frente a OVA + *B. longum* + IgE<sub>TRAP</sub> y OVA frente a PBS: \*\*\*P < .0001
- 45 La figura 25 ilustra los resultados obtenidos al identificar efectos inhibidores sobre la proliferación de mastocitos y la proliferación de células caliciformes en respectivos grupos experimentales, en el momento de la administración de IgE<sub>TRAP</sub>, *B. longum* y una combinación de los mismos, en un modelo de enfermedad inducida por alergia alimentaria. Se muestran los resultados obtenidos mediante la tinción de células caliciformes para su identificación en secciones representativas de parafina del yeyuno en los respectivos grupos experimentales (púrpura, aumento 400x).
- 50 La figura 26 ilustra los resultados obtenidos seleccionando aleatoriamente células caliciformes de unidades de vellosidades-criptas (VCU) en la figura 25 y contando 10 VCU. n = 5 a 6 ratones por grupo, OVA frente a *B. longum* y OVA frente a IgE<sub>TRAP</sub>: \*P .05, OVA frente a OVA + *B. longum* + IgE<sub>TRAP</sub> y OVA frente a PBS: \*\*\*P < .0001

- 5 La figura 27 ilustra un diagrama esquemático del mecanismo de inhibición de la alergia alimentaria causada por la terapia combinada con *B. longum* e IgE<sub>TRAP</sub>. Los alérgenos alimentarios ingeridos pueden inducir la activación de las células efectoras (mastocitos y basófilos) mediante la unión de la IgE a un receptor Fc de IgE de alta afinidad (FcεRI) en las células efectoras. Las células efectoras activadas liberan moduladores, ocasionando así una reacción de hipersensibilidad inmediata. *B. longum* induce la apoptosis de los mastocitos mediante la secreción de vesículas extracelulares (EV) que disminuyen el número de mastocitos. Mientras tanto, IgE<sub>TRAP</sub> puede bloquear la unión de IgE a FcεRI en las células efectoras y, de este modo, inhibir la activación y proliferación de las células efectoras. La administración combinada de *B. longum* e IgE<sub>TRAP</sub> permitió aliviar eficazmente los síntomas de alergia alimentaria y la hiperplasia de células caliciformes.
- 10 La figura 28 ilustra un gráfico obtenido identificando cambios en la expresión de IL-33 en tejido intestinal después de la administración de *B. longum* e IgE<sub>TRAP</sub>. La administración de *B. longum* e IgE<sub>TRAP</sub> disminuyó la expresión del ARNm de IL-33 en el yeyuno de ratones modelo de alergia alimentaria. n = 16 a 18 ratones por grupo, OVA frente a OVA + *B. longum* + IgE<sub>TRAP</sub>. \*P < .05
- 15 La figura 29 ilustra un gráfico obtenido identificando la frecuencia de la diarrea después de la inyección intraperitoneal de IgE<sub>TRAP</sub> y *L. casei*. n = 7 a 10 ratones por grupo
- La figura 30 ilustra un gráfico obtenido identificando la frecuencia de la diarrea después de la inyección intraperitoneal de IgE<sub>TRAP</sub> y *Lc. lactis*. n = 5 ratones por grupo
- La figura 31 ilustra un gráfico obtenido identificando la frecuencia de la diarrea después de la inyección intraperitoneal de IgE<sub>TRAP</sub> y *S. thermophilus*. n = 6 a 10 ratones por grupo
- 20 La figura 32 ilustra un gráfico obtenido identificando la frecuencia de la diarrea después de la inyección intraperitoneal de IgE<sub>TRAP</sub> y *L. rhamnosus*. n = 5 a 10 ratones por grupo
- La figura 33 ilustra un gráfico obtenido identificando la frecuencia de la diarrea después de la inyección intraperitoneal de IgE<sub>TRAP</sub> y *L. reuteri*. n = 5 a 10 ratones por grupo
- 25 La figura 34 ilustra un gráfico obtenido identificando la frecuencia de la diarrea después de la inyección intraperitoneal de IgE<sub>TRAP</sub> y *L. fermentum*. n = 7 a 10 ratones por grupo
- La figura 35 ilustra un gráfico obtenido administrando IgE<sub>TRAP</sub> por vía oral a ratones normales y luego identificando IgE<sub>TRAP</sub> adsorbida en el suero de los ratones.
- Descripción detallada de la invención
- 30 El tema divulgado a continuación no forma parte de la invención como tal que se define en las reivindicaciones. Los términos "descrito", "divulgación" y "ejemplo", como se usan en este documento, se refieren a información que puede ser útil en el contexto o interpretación de la presente invención pero no forma parte de la invención reivindicada.
- Las referencias a métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía o métodos de diagnóstico in vivo en esta descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos.
- 35 En este documento se divulga una composición que comprende, como ingredientes activos, probióticos y un polipéptido con capacidad de unión a IgE.
- Como se usa en este documento, el término "probióticos" se refiere colectivamente a microorganismos que son favorables para el cuerpo humano en el caso de ser ingeridos en una cantidad apropiada, lo que indica bacterias beneficiosas para el cuerpo humano. Como se describe en este documento, los probióticos pueden ser bacterias ácido lácticas o Bifidobacterium. Como se describe en este documento, las bacterias ácido lácticas se refieren colectivamente a bacterias que fermentan el azúcar para producir ácido láctico. La mayoría de las bacterias beneficiosas intestinales se clasifican como bacterias ácido lácticas, y las bacterias ácido lácticas pueden degradar los azúcares, de los cuales el 50 % o más se produce como ácido láctico.
- 40 Como se describe en este documento, las bacterias ácido lácticas pueden ser una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. Específicamente, como se describe en este documento, el *Lactobacillus* puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus* y *L. salivarius*. Además, como se describe en este documento, el *Lactococcus* puede ser *Lc. lactis* y el *Streptococcus* puede ser *S. thermophilus*. Además, como se describe en este documento, la Bifidobacterium puede ser una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* y *B. animalis ssp. lactis*.
- 45 Como se describe en este documento, las bacterias ácido lácticas pueden ser una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. Específicamente, como se describe en este documento, el *Lactobacillus* puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus* y *L. salivarius*. Además, como se describe en este documento, el *Lactococcus* puede ser *Lc. lactis* y el *Streptococcus* puede ser *S. thermophilus*. Además, como se describe en este documento, la Bifidobacterium puede ser una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* y *B. animalis ssp. lactis*.
- 50 Preferiblemente, como se describe en este documento, los probióticos pueden ser *Lactobacillus casei* o *Bifidobacterium longum*. En particular, *Bifidobacterium longum* puede ser el No. de acceso KACC 91563 (KR10-

1778734B1). En particular, como se describe en este documento, la cepa KACC 91563 se dirige a los mastocitos que son células importantes en las reacciones alérgicas y, de este modo, pueden usarse como bacterias ácido lácticas para tratar la alergia. Normalmente, como se describe en este documento, los probióticos se pueden usar en forma de bacterias vivas, en las que las bacterias vivas se pueden usar en forma liofilizada. Además, como se describe en este documento, los probióticos se pueden usar en forma de bacterias muertas.

Como se usa en este documento, el término "polipéptido con capacidad de unión a IgE" significa un polipéptido capaz de unirse a IgE. Como se usa en este documento, el término "IgE" significa una proteína anticuerpo conocida como inmunoglobulina E. La IgE tiene afinidad por los mastocitos, los basófilos sanguíneos o similares. Además, la reacción entre un anticuerpo IgE y un antígeno (alérgeno) correspondiente al mismo provoca una reacción inflamatoria. Además, se sabe que la IgE es un anticuerpo que causa anafilaxia.

Específicamente, como se describe en este documento, el polipéptido con capacidad de unión a IgE puede ser cualquiera de las proteínas recombinantes que incluyen un anticuerpo anti-IgE, un receptor Fc de IgE, un dominio extracelular de una subunidad alfa del receptor Fc de IgE, un fragmento del dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE, y un dominio extracelular de una subunidad alfa del receptor Fc de IgE o un fragmento del mismo.

Aquí, el anticuerpo anti-IgE significa un anticuerpo capaz de reconocer la IgE como antígeno y unirse a la IgE. Como se describe en este documento, un fragmento del anticuerpo anti-IgE puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en Fab, scFv, F(ab)<sup>2</sup> y Fv, siempre que el fragmento pueda unirse a IgE. Fragmentos de anticuerpo significan dominios de unión a antígeno que excluyen una región cristalizadora (región Fc) que realiza una función (función efectora) para transferir, a una célula o a un complemento, un estímulo debido a la unión con un antígeno. En un ejemplo, el anticuerpo anti-IgE puede ser el omalizumab.

Como se usa en este documento, el término "receptor Fc de IgE" también se denomina receptor Fc $\epsilon$  y se une a una porción Fc de IgE. Hay dos tipos de receptor. El receptor que tiene alta afinidad por IgE Fc se llama receptor I de Fc $\epsilon$  (Fc $\epsilon$ RI). El receptor que tiene baja afinidad por IgE Fc se denomina receptor II de Fc $\epsilon$  (Fc $\epsilon$ RII). Fc $\epsilon$ RI se expresa en mastocitos y basófilos. En el caso de que los anticuerpos IgE unidos a Fc $\epsilon$ RI estén entrecruzados por antígenos polivalentes, se produce una desgranulación en los mastocitos o basófilos, liberando así diversas sustancias químicas transmisoras, incluida la histamina. Esta liberación provoca una reacción alérgica inmediata.

El Fc $\epsilon$ RI es una proteína de membrana compuesta por una cadena  $\alpha$ , una cadena  $\beta$  y dos cadenas  $\gamma$  unidas por un enlace disulfuro. Entre estas cadenas, una porción a la que se une la IgE es la cadena  $\alpha$  (Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ), y Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  tiene un tamaño de aproximadamente 60 kDa. Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  está compuesto por un dominio hidrofóbico que existe dentro de la membrana celular y un dominio hidrofílico que existe fuera de la membrana celular. En particular, la IgE se une a un dominio extracelular de la cadena  $\alpha$ .

Específicamente, como se describe en este documento, la subunidad alfa del receptor Fc de IgE puede tener la secuencia de aminoácidos establecida en NP\_001992.1. Además, como se describe en este documento, el dominio extracelular (Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ECD) de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Como se describe en este documento, el dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE puede ser un fragmento o variante del dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE, siempre que el fragmento o variante sea capaz de unirse a IgE.

Como se describe en este documento, la producción de la variante se puede lograr mediante un método de sustitución, deleción o adición de una o más proteínas en el Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ECD (dominio extracelular) de tipo salvaje, siempre que el método no altere una función de la cadena  $\alpha$  de Fc $\epsilon$ RI. Como se describe en este documento, tales diversas proteínas o péptidos pueden ser 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idénticos a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Además, como se describe en este documento, el Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ECD de SEQ ID NO: 1 puede estar codificado por un polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5.

Por lo tanto, como se describe en este documento, el propio dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE o un fragmento del dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE se puede usar como polipéptido con capacidad de unión a IgE. Como se describe en este documento, el fragmento del dominio extracelular puede estar en una forma en la que algunos de los aminoácidos en el extremo N del dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE estén suprimidos. En un ejemplo, el fragmento del dominio extracelular puede ser uno en el que se eliminan de 1 a 30 aminoácidos en el extremo N. Además, como se describe en este documento, el fragmento del dominio extracelular puede ser uno en el que se suprimen de 5 a 25 aminoácidos en el extremo N. Además, como se describe en este documento, el fragmento del dominio extracelular puede estar en una forma en la que algunos de los aminoácidos en el extremo C del dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE se suprimen. En un ejemplo, el fragmento del dominio extracelular puede ser uno en el que se suprimen de 1 a 30 aminoácidos en el extremo C. Además, como se describe en este documento, el fragmento del dominio extracelular puede ser uno en el que se suprimen de 5 a 25 aminoácidos en el extremo C-terminal. Además, como se describe en este documento, el fragmento del dominio extracelular puede estar en una forma en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos en el extremo C se suprimen. Además, un

ejemplo del fragmento del dominio extracelular puede estar en una forma en la que algunos de los aminoácidos en el extremo N y el extremo C del dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE se suprimen. En un ejemplo, el fragmento del dominio extracelular puede estar en una forma en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, respectivamente, en el extremo N y el extremo C se suprimen.

- 5 Sin embargo, el dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor de IgE de tipo salvaje, o un fragmento del mismo, es poco persistente en el cuerpo. Para mejorar esto, el dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor de IgE, o un fragmento del mismo, puede modificarse mediante diversos métodos. Como ejemplo del método de modificación, se puede unir polietilenglicol (PEG). Como otro ejemplo del método de modificación, se puede unir al mismo una región Fc de una inmunoglobulina. Como se describe en este documento, además de una forma nativa de  
10 inmunoglobulina Fc, se usa una región Fc modificada.

Además, como se usa en este documento, el término "región Fc modificada" significa una región en la que se ha modificado una parte de una porción Fc de un anticuerpo. Aquí, el término "región Fc" se refiere a una proteína que contiene la región constante 2 de la cadena pesada (CH2) y la región constante 3 de la cadena pesada (CH3) de una inmunoglobulina, y no contiene regiones variables de cadenas pesadas y ligeras, ni región constante de cadena ligera  
15 1 (CH1) de una inmunoglobulina. En particular, la región Fc modificada significa una región obtenida sustituyendo algunos aminoácidos en la región Fc o combinando diferentes tipos de regiones Fc. Específicamente, la región Fc modificada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Además, como se describe en este documento, la región Fc modificada de SEQ ID NO: 2 puede estar codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6.

20 Además, la región Fc modificada descrita en este documento puede tener cadenas de azúcar en una forma nativa, cadenas de azúcar aumentadas con respecto a una forma nativa, o cadenas de azúcar disminuidas con respecto a una forma nativa, o puede estar en la forma de cadena de azúcar eliminada. Como se describe en este documento, las cadenas de azúcar Fc de inmunoglobulina pueden modificarse mediante métodos convencionales tales como métodos químicos, métodos enzimáticos y métodos de ingeniería genética que usan microorganismos.

25 Como se describe en este documento, la región Fc modificada puede ser una región que carece de funciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) debido a que no tiene un sitio de unión para FcγR o C1q.

Además, como se describe en este documento, el FcεRIα-ECD o un fragmento del mismo se puede unir a una región Fc de tipo salvaje o Fc modificada mediante un enlazante. Como se describe en este documento, el enlazante puede  
30 estar compuesto de 20 a 60 aminoácidos consecutivos, de 25 a 50 aminoácidos consecutivos o de 30 a 40 aminoácidos. En un ejemplo, el enlazante puede estar compuesto de 30 o 49 aminoácidos como se muestra a continuación. Además, el enlazante puede contener al menos una cisteína. Específicamente, como se describe en este documento, el enlazante puede contener una, dos o tres cisteínas. Preferiblemente, como se describe en este documento, el enlazante puede contener una cisteína. En un ejemplo, el enlazante puede ser una región bisagra  
35 derivada de un anticuerpo IgD. Además, como se describe en este documento, el enlazante puede ser una variante bisagra obtenida modificando la región bisagra del anticuerpo IgD. Como se describe en este documento, la variante bisagra se puede obtener modificando algo en una secuencia bisagra del anticuerpo IgD para minimizar la generación de formas truncadas durante un procedimiento de producción de proteínas.

En un ejemplo, la bisagra puede contener la siguiente secuencia:

40 Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa1 Xaa2 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (SEQ ID NO: 17), donde Xaa1 puede ser Lys o Gly, y Xaa2 puede ser Glu, Gly o Ser. Específicamente, como se describe en este documento, el enlazante puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 19, minimizando así la generación de formas truncadas durante un procedimiento de producción de proteínas.

En otro ejemplo, la bisagra puede contener la siguiente secuencia:

45 Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa3 Xaa4 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (SEQ ID NO: 18), donde Xaa3 puede ser Lys o Gly, y Xaa4 puede ser Glu, Gly o Ser. Específicamente, como se describe en este documento, el enlazante puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, minimizando así la generación de formas truncadas durante un procedimiento de producción de proteínas.

50 En particular, como se describe en este documento, en el enlazante que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, al menos uno de los Thr puede estar glicosilado. Específicamente, como se describe en este documento, entre los aminoácidos de SEQ ID NO: 18, los Thr 13<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 18<sup>o</sup> y 19<sup>o</sup> pueden estar glucosilados. Preferiblemente, como se describe en este documento, los cuatro aminoácidos pueden estar glucosilados. En este caso, la glucosilación puede ser O-glucosilación.

55 IgE<sub>TRAP</sub>, que es un ejemplo del polipéptido con capacidad de unión a IgE de la presente divulgación, significa una proteína de fusión Fc de un dominio extracelular FcεRIα y un dominio Fc híbrido IgD/IgG4. El receptor FcεR de IgE Fc consta de una cadena α, una cadena β y dos cadenas γ idénticas unidas por enlaces disulfuro. FcεRIβ y FcεRIγ no

5 tienen dominio extracelular. Sin embargo, FcεRIα tiene dos dominios extracelulares relacionados con inmunoglobulinas y participa en la unión de IgE. De este modo, para producir un inhibidor de IgE más seguro y eficaz, se unió un dominio extracelular FcεRIα humano a un dominio Fc híbrido IgD/IgG4 humano (Figuras 1 y 2) para producir IgE<sub>TRAP</sub>. A diferencia del omalizumab, IgE<sub>TRAP</sub> no se une a receptores de IgG y es probable que disminuya el riesgo de anafilaxia mediada por IgG (Figuras 9 a 13). Además, IgE<sub>TRAP</sub> tiene una afinidad por la IgE que es 69 veces mayor que la del omalizumab. De este modo, IgE<sub>TRAP</sub> sería más seguro y eficaz que omalizumab como agente terapéutico para la alergia alimentaria.

10 El polipéptido con capacidad de unión a IgE sirve para bloquear la unión entre FcεRIα en las células efectoras y la IgE. El Fc híbrido IgD/IgG4 humano contiene el dominio CH2 superior de IgD y los últimos dominios CH2 y CH3 de IgG4, que no tienen un sitio de unión para FcγR o C1q (Figura 1). Sin embargo, este Fc híbrido puede tener un sitio de unión para un receptor de Fc neonatal (Figura 1). Además, el peso molecular teórico de IgE<sub>TRAP</sub> en forma homodimérica es de aproximadamente 97.6 kDa. Sin embargo, su peso molecular real es de aproximadamente 150 kDa debido a la glucosilación (Figura 6).

15 La proteína dimérica de polipéptidos con capacidad de unión a IgE no sólo tiene una excelente seguridad y persistencia en el cuerpo en comparación con los anticuerpos anti-IgE usados convencionalmente, sino que también se une muy fuertemente a IgE debido a que tiene una capacidad de unión a IgE que es de aproximadamente 70- veces mayor que el anticuerpo anti-IgE usado convencionalmente, el omalizumab, lo que permite un ciclo de administración prolongado. Además, la proteína dimérica de polipéptidos es una sustancia que se obtiene aplicando un Fc modificado, que tiene IgE sola como objetivo único y no se une a un receptor Fc gamma, y de este modo carece de las funciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por lo tanto, a diferencia de los anticuerpos anti-IgE convencionales que contienen una región Fc de IgG1, la proteína dimérica de polipéptidos no se une a un receptor Fc gamma y, de este modo, puede inhibir la liberación de mediadores causada por estar unida al receptor Fc gamma en la superficie de los mastocitos. Por lo tanto, el polipéptido con capacidad de unión a IgE puede minimizar los efectos secundarios intensos tales como la aparición de anafilaxia que puede ser causada por la unión entre IgG1 y el receptor Fc gamma III en los mastocitos. De acuerdo con lo anterior, la proteína dimérica de polipéptidos se puede usar como una nueva composición farmacéutica que puede reemplazar a los agentes terapéuticos que contienen un anticuerpo anti-IgE convencional.

25 Además, un ejemplo del polipéptido con capacidad de unión a IgE que se proporciona en la presente divulgación puede estar en forma de un monómero. Como se describe en este documento, en el caso donde no hay cisteína en el enlazante usado, el polipéptido puede estar en forma monomérica.

30 El polipéptido con capacidad de unión a IgE, proporcionado por la presente invención, es un dímero de polipéptido. Aquí, como se describió anteriormente, el dímero de polipéptido está en una forma en la que dos monómeros están unidos entre sí y cada monómero se obtiene mediante la unión entre un dominio extracelular de una subunidad alfa de un receptor Fc de IgE y una región Fc modificada. Como se describe en este documento, el dímero de polipéptido puede estar en una forma en la que los mismos dos monómeros están unidos entre sí mediante cisteína ubicada en un sitio enlazante. Además, como se describe en este documento, el dímero de polipéptido puede estar en una forma en la que dos monómeros diferentes estén unidos entre sí. Por ejemplo, en el caso de que los dos monómeros son diferentes entre sí, el dímero de polipéptido puede estar en una forma en la que un monómero contiene el dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE, y el otro monómero contiene un fragmento del dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE. Aquí, un ejemplo del monómero puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22.

También se divulga en este documento una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad alérgica, que comprende una composición que contiene, como ingredientes activos, probióticos y un polipéptido con capacidad de unión a IgE.

45 Los probióticos y el polipéptido con capacidad de unión a IgE son como se describen anteriormente. Se puede determinar apropiadamente una cantidad de mezcla de los probióticos y el polipéptido con capacidad de unión a IgE en la composición. En un ejemplo, los probióticos en la composición pueden estar contenidos en una cantidad de  $1 \times 10^5$  ufc a  $1 \times 10^{12}$  ufc. Alternativamente, como se describe en este documento, los probióticos en la composición pueden estar contenidos en una cantidad de  $1 \times 10^6$  ufc a  $1 \times 10^{11}$  ufc,  $1 \times 10^7$  ufc a  $1 \times 10^{10}$  ufc, o  $1 \times 10^9$  ufc a  $5 \times 10^9$  ufc. Además, como se describe en este documento, el polipéptido con capacidad de unión a IgE puede estar contenido en una cantidad de, pero no se limita a, 0.1 ug a 5 mg, 0.5 ug a 1 mg, 1 ug a 500 ug, 10 ug a 400 ug, o 200 ug a 300 ug. Además, como se describe en este documento, se puede alterar apropiadamente la proporción de mezcla de los probióticos y el polipéptido con capacidad de unión a IgE en la composición.

55 En la presente memoria descriptiva, "enfermedad alérgica" significa un síntoma patológico causado por una reacción alérgica mediada por la activación de los mastocitos tal como la desgranulación de los mastocitos. Como se describe en este documento, dichas enfermedades alérgicas incluyen alergia alimentaria, dermatitis atópica, asma, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica, dermatitis alérgica de contacto, anafilaxia, urticaria, prurito, alergia a insectos, urticaria idiopática crónica, alergia a fármacos y similares. En particular, como se describe en este documento, las enfermedades alérgicas pueden estar mediadas por IgE.

En un ejemplo, un polipéptido con capacidad de unión a IgE que contiene un dominio extracelular FcεRIα bloquea la unión de IgE a FcεRI en células efectoras mediante su unión con IgE y, de este modo, puede denominarse IgE<sub>TRAP</sub>. Además, como se describe en este documento, se identificó que *B. longum* puede mejorar el efecto terapéutico de IgE<sub>TRAP</sub> y disminuir notablemente la dosis de IgE<sub>TRAP</sub> requerida para el tratamiento.

5 En la composición para tratar o prevenir una enfermedad alérgica de la presente divulgación, un ingrediente activo puede estar contenido en cualquier cantidad (cantidad eficaz) dependiendo del uso, la formulación, el propósito de la mezcla y similares, siempre que el ingrediente activo pueda exhibir propiedades actividad antialérgica. Como se describe en este documento, una cantidad eficaz típica del ingrediente activo se puede determinar dentro de un intervalo de 0.001 % en peso a 20.0 % en peso basado en el peso total de la composición. Aquí, "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un ingrediente activo que es capaz de inducir un efecto antialérgico. Dicha cantidad eficaz puede determinarse experimentalmente dentro de la experiencia habitual de los expertos en la técnica.

10 Como se describe en este documento, la composición farmacéutica puede contener además un portador farmacéuticamente aceptable. Como portador farmacéuticamente aceptable, se puede usar cualquier portador siempre que el portador sea una sustancia no tóxica apropiada para su administración a un paciente. Como se describe en este documento, puede contener como portadores agua destilada, alcohol, grasa, cera y un sólido inerte. Como se describe en este documento, la composición farmacéutica también puede contener adyuvantes farmacológicamente aceptables (soluciones reguladoras y dispersantes). Como se describe en este documento, se puede usar cualquier formulación farmacéuticamente aceptable siempre que los probióticos y el polipéptido con capacidad de unión a IgE puedan mantener su estabilidad en la formulación.

15 Como se describe en este documento, la composición farmacéutica puede contener, además de los ingredientes activos, un portador farmacéuticamente aceptable y puede convertirse en una formulación oral o parenteral dependiendo de la vía de administración mediante un método convencional conocido en la técnica. Aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" significa que no tiene más toxicidad de la que un sujeto al que se va a aplicar (recetar) puede soportar sin inhibir la actividad del ingrediente activo.

20 En caso de que la composición farmacéutica se convierta en una formulación oral, como se describe en este documento, la composición farmacéutica se puede convertir en formulaciones tales como polvos, gránulos, comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y obleas, junto con portadores apropiados, según métodos conocidos en la técnica. Como se describe en este documento, los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables apropiados pueden incluir azúcares tales como lactosa, glucosa, sacarosa, dextrosa, sorbitol, manitol y xilitol, almidones tales como almidón de maíz, almidón de patata y almidón de trigo, celulosas tales como celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica e hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, estearato de magnesio, aceite mineral, malta, gelatina, talco, poliol, aceite vegetal y similares. En el caso de convertirse en preparaciones, como se describe en este documento, las preparaciones se pueden llevar a cabo, según sea necesario, incluyendo diluyentes y/o excipientes tales como una carga, un extensor, un aglutinante, un agente humectante, un desintegrante y un surfactante.

25 En caso de que la composición farmacéutica se convierta en una formulación parenteral, como se describe en este documento, la composición farmacéutica se puede convertir en preparaciones en forma de inyecciones, fármacos transdérmicos, inhaladores nasales y supositorios, junto con portadores apropiados, de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. En caso de prepararse en forma de inyecciones, como se describe en este documento, se puede usar agua esterilizada, etanol, poliol tal como glicerol y propilenglicol, o una mezcla de los mismos, como portador apropiado. Para el portador, como se describe en este documento, se pueden usar preferiblemente soluciones isotónicas tales como solución de Ringer, solución salina regulada con fosfato (PBS) que contiene trietanolamina, agua estéril para inyección y dextrosa al 5 %, y similares.

30 La preparación de la composición farmacéutica es conocida en la técnica y, específicamente, se puede hacer referencia a Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995) y similares.

35 Una dosificación diaria preferible de la composición farmacéutica de la presente divulgación oscila entre 0.01 ug/kg y 10 g/kg, y preferiblemente entre 0.01 mg/kg y 1 g/kg, dependiendo del estado del paciente, peso corporal, sexo, edad, gravedad de la enfermedad o vía de administración. Como se describe en este documento, la administración se puede realizar una o varias veces al día.

40 Como se describe en este documento, el sujeto al que se puede aplicar (recetar) la composición es un mamífero y un ser humano, siendo particularmente preferido un ser humano. Como se describe en este documento, la composición antialérgica puede comprender además, además del ingrediente activo, cualquier compuesto o extracto natural, sobre el cual ya se ha verificado la seguridad y del que se sabe que tiene actividad antialérgica, con el fin de aumentar y reforzando la actividad antialérgica. Como se describe en este documento, la composición farmacéutica puede comprender además retículo endoplasmático extracelular aislado de *Bifidobacterium longum* KACC 91563.

También se divulga en este documento una composición alimentaria funcional para la salud para la mejora o alivio de un síntoma alérgico, que comprende una composición que contiene, como ingredientes activos, probióticos y un

polipéptido con capacidad de unión a IgE. Como se describe en este documento, la composición alimentaria puede comprender además, como ingrediente activo, retículo endoplasmático extracelular aislado de *Bifidobacterium longum* KACC 91563.

5 Mientras tanto, la composición alimentaria de la presente divulgación puede comprender además un portador sitológicamente aceptable. Además, como se describe en este documento, la composición alimentaria se puede usar junto con otro alimento o ingrediente alimentario, y se puede usar adecuadamente según métodos convencionales. Como se describe en este documento, la cantidad de mezcla del ingrediente activo se puede determinar adecuadamente según su uso previsto (prevención, salud o tratamiento terapéutico).

10 No existe ninguna limitación particular sobre el tipo de alimento. Ejemplos de alimentos incluyen carnes, salchichas, pan, chocolates, dulces, snacks, dulces, productos lácteos, incluidos helados, diversas sopas, bebidas, té, refrescos, bebidas alcohólicas y complejos vitamínicos. Se incluyen todos los alimentos saludables funcionales en el sentido convencional. Como se describe en este documento, los alimentos a los que se pueden agregar las sustancias anteriores contienen ingredientes que por lo general se agregan durante la fabricación, y ejemplos de ingredientes incluyen proteínas, carbohidratos, grasas, nutrientes, agentes saborizantes y condimentos. Como se describe en este documento, los carbohidratos mencionados anteriormente son azúcares típicos, por ejemplo, un monosacárido tal como glucosa y fructosa, un disacárido tal como maltosa y sacarosa, y un polisacárido tal como dextrina y ciclodextrina, y alcohol de azúcar tal como xilitol, sorbitol, y eritritol. Como se describe en este documento, como agente aromatizante, se puede usar un agente aromatizante natural tal como taumatina y un extracto de estevia, un agente aromatizante sintético tal como sacarina y aspartamo, o similares.

20 Por ejemplo, en caso de que la composición alimentaria de la presente divulgación se prepare como una bebida, la puede contener además ácido cítrico, fructosa líquida, azúcar, glucosa, ácido acético, ácido málico, jugo, extracto o similares.

25 Además de lo anterior, la composición de la presente divulgación puede contener diversos nutrientes, vitaminas, electrolitos, saborizantes, colorantes, ácido péctico y sales de los mismos, ácido algínico y sus sales, ácidos orgánicos, espesantes coloides protectores, agentes de ajuste del pH, estabilizantes, conservantes, glicerina, alcohol, agentes carbonatados usados en bebidas carbonatadas y similares. Además, la composición de la presente divulgación puede contener pulpa para la producción de bebidas de zumos de frutas y bebidas vegetales. Como se describe en este documento, estos ingredientes se pueden usar de forma independiente o mezclados.

30 Además, la composición alimentaria de la presente divulgación puede caer dentro de cualquier categoría de producto en clasificación legal o funcional siempre que la composición alimentaria cumpla con las regulaciones de aplicación al momento de ser fabricada y distribuida. Por ejemplo, la composición alimentaria puede ser un alimento funcional para la salud según la Ley de Alimentos Funcionales para la Salud, o puede incluirse en dulces, frijoles, té, bebidas, alimentos para fines especiales o similares según cada tipo de alimento en el Código Alimentario de la Ley de Sanidad Alimentaria (normas y especificaciones para alimentos, notificadas por Food and Drug Administration). Con respecto a otros aditivos alimentarios que pueden estar contenidos en la composición alimentaria de la presente divulgación, se puede hacer referencia al Código Alimentario o al Código de Aditivos Alimentarios según la Ley de Sanidad Alimentaria.

40 También se divulga en este documento un kit para tratar o prevenir una enfermedad alérgica, que comprende una primera composición que contiene probióticos; y una segunda composición que contiene un polipéptido con capacidad de unión a IgE. Como se describe en este documento, la segunda composición puede ser una composición para administración subcutánea o intravenosa.

También se divulga en este documento un método para tratar o prevenir una enfermedad alérgica, que comprende una etapa de administrar probióticos; y administrar un polipéptido con capacidad de unión a IgE.

45 Los probióticos son como se describen anteriormente y pueden administrarse por vía oral. Como se describe en este documento, el polipéptido con capacidad de unión a IgE se puede administrar por vía oral y se puede administrar por vía parenteral. Como se describe en este documento, la administración parenteral se puede llevar a cabo mediante un método tal como administración subcutánea, administración intravenosa, administración mucosa o similares. En un modelo de alergia alimentaria en ratones, se ha demostrado que IgE<sub>TRAP</sub> no sólo reduce el nivel de IgE libre sino que también disminuye el número de mastocitos, aliviando así los síntomas de alergia alimentaria (Figuras 21 a 26). Se espera que una disminución del número de mastocitos causada por IgE<sub>TRAP</sub> se deba al hecho de que la IgE aumenta el número de mastocitos al aumentar la tasa de supervivencia de los mastocitos. Además, la sobreproliferación de células calciformes en el intestino delgado se inhibió significativamente mediante la administración de IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* solos, y se inhibió aún más en el momento de la administración combinada (Figuras 23 a 26). Dado que se sabe que las citocinas Th2, tales como la IL-13, inducen una proliferación excesiva de células calciformes, se espera que IgE<sub>TRAP</sub>, *B. longum* y una combinación de los mismos mitiguen un entorno para las citocinas Th2 en el intestino delgado. Como respaldo a esto, IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* mostraron una tendencia a disminuir la expresión del ARNm de IL-33, que participa en la promoción de la secreción de IL-13, en el intestino delgado, mediante la activación de las células linfoides innatas tipo 2 (ILC2); y una combinación de los mismos disminuyó significativamente la expresión de IL-33 de una manera más eficaz (Figura 28). Además, la IL-33 no solo se secreta en los mastocitos activados por IgE,

sino que también participa en la promoción de la desgranulación de los mastocitos. De este modo, la IL-33 tiene una estrecha correlación con la gravedad de las alergias alimentarias. Esto sugiere que IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* pueden mejorar los síntomas de alergia alimentaria mediante diversos mecanismos.

5 Anteriormente, se había informado que *B. longum* inducía la apoptosis de los mastocitos y mejoraba los síntomas alérgicos a los alimentos, lo que concuerda con los resultados de los presentes inventores. Sin embargo, la administración diaria de *B. longum* para el tratamiento de la alergia alimentaria fue menos eficaz que la administración de IgE<sub>TRAP</sub> solo. Sin embargo, *B. longum* mejoró notablemente el efecto terapéutico de IgE<sub>TRAP</sub> (Figura 18), e IgE<sub>TRAP</sub> usado en combinación con *B. longum* exhibió un efecto terapéutico similar al obtenido mediante la administración de IgE<sub>TRAP</sub> solo en una dosis 10 veces mayor (Figura 19B). Además, se ha informado que algunas bacterias intestinales  
10 pueden mejorar una enfermedad alérgica aumentando las células Treg o disminuyendo los niveles de citocinas IgE y Th2. De este modo, se espera que otros probióticos además de *B. longum* sean capaces de mejorar el efecto terapéutico de IgE<sub>TRAP</sub>. De hecho, se identificó que se exhibe un efecto terapéutico elevado en el momento de la administración combinada de diversos tipos de probióticos e IgE<sub>TRAP</sub> (Figuras 29 a 34).

15 También se divulga en este documento un método para tratar o prevenir una enfermedad alérgica, que comprende una etapa de administrar, a un individuo, el polipéptido con capacidad de unión a IgE y los probióticos en combinación. Como se describe en este documento, el individuo puede ser un mamífero, preferiblemente un ser humano. Como se describe en este documento, la administración puede realizarse por vía oral o parenteral. Como se describe en este documento, el polipéptido con capacidad de unión a IgE y los probióticos se puede preparar en formulaciones adecuadas para administración oral. Además, como se describe en este documento, la administración parenteral se  
20 puede realizar mediante métodos tales como administración subcutánea, administración intravenosa, administración mucosa y administración muscular.

Descripción detallada de la invención

En lo que sigue, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

Materiales y métodos

25 Construcción de línea celular para IgE<sub>TRAP</sub> y purificación de la misma.

Se construyó una secuencia de nucleótidos de IgE<sub>TRAP</sub> uniendo el extremo C (del 26° al 205°) del dominio extracelular Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  al extremo N del dominio Fc híbrido IgD/IgG4 (IgD, del 133° al 170°; IgG4, del 121° al 327°). La proteína se expresó en células DG44 de ovario de hámster chino deficientes en dihidrofolato reductasa. IgE<sub>TRAP</sub> se purificó usando  
30 la columna HiTrap rProtein A FF (GE Healthcare) y su pureza se identificó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras.

Modelado de estructuras 3D

Se diseñó un modelo estructural de IgE<sub>TRAP</sub> usando WinCoot y se construyó con el software PyMOL sobre la base de información sobre Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  (acceso PDB 1F6A) e IgD/IgG4 Fc (acceso PDB 1ADQ) del Protein Data Bank.

Ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR)

35 El ensayo SPR se realizó usando el aparato ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Se identificó un grado de unión del omalizumab e IgE<sub>TRAP</sub> a la IgE humana (Calbiochem) mediante análisis cinético. Se inmovilizaron 850 unidades de respuesta (RU) del omalizumab en solución reguladora acetato (pH 5.5) y 500 RU de IgE<sub>TRAP</sub> en solución reguladora de acetato (pH 4.0) en el chip sensor ProteOn™ GLC (Bio-Rad). Se usó PBS que contenía Tween-20 como solución reguladora de funcionamiento y se fijó un caudal de 30  $\mu$ l/min. Se analizó un gráfico de cada conjunto de datos usando el software  
40 ProteOn Manager (Bio-Rad).

Ensayo de interferometría de biocapa (BLI)

Se identificó el grado de unión de IgE<sub>TRAP</sub> y omalizumab a los receptores de IgG usando el sistema Octet RED384 (Pall ForteBio, CA, EE. UU.). Las proteínas recombinantes Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIIA y Fc $\gamma$ RIIIB (R & D Systems Inc., 5  $\mu$ g/ml) que se habían diluido en solución reguladora acetato 300 mM (pH 5) se inmovilizaron en el biosensor Amine Reactive 2 Generation (AR2G) activado por una combinación de EDC 400 mM y sulfo-NHS 10 mM. Luego, se midió la asociación y la disociación de IgE<sub>TRAP</sub> y omalizumab en diversas concentraciones, respectivamente,  
45 durante 300 segundos. Aquí, la solución reguladora cinética usada fue PBS que contenía 0.1 % de Tween-20 y 1 % de suero bovino, y todos los experimentos se llevaron a cabo a 30 °C con un agitador de placas de muestra a una velocidad de 1,000 rpm.

50 Ensayo de liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa

Se cultivaron mastocitos derivados de la médula ósea (BMDC) a 37 °C en RPMI que contenía 10 % de FBS inactivado por calor, 10 ng/mL de IL-3 de ratón (PeproTech, Inc.) y 50 ng/ml de SCF de ratón (PeproTech, Inc.). Antes del análisis, se incubaron 1  $\mu$ g/mL de IgE anti-dinitrofenilo (Sigma-Aldrich) y diversas concentraciones de IgE<sub>TRAP</sub> a temperatura

ambiente durante 30 minutos. Los mastocitos derivados de la médula ósea se incubaron en una mezcla de IgE anti-dinitrofenilo (Sigma-Aldrich) e IgE<sub>TRAP</sub> a 37 °C, durante 30 minutos, y se les agregó 0.1 µg/ml de IgE anti-dinitrofenilo. El resultante se incubó nuevamente a 37 °C, durante 30 minutos. El sobrenadante del cultivo se recogió y se incubó con p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida 3 mM a 37 °C, durante 20 minutos. Se agregó solución reguladora carbonato de sodio 0.1 M (pH 10) para detener la reacción y se midió la absorbancia a 405 nm. Se calculó una proporción de β-hexosaminidasa liberada en comparación con un contenido intracelular total de BMCC disueltos con Triton X-100 al 0.1 %.

Inducción de alergia alimentaria y administración de *B. longum*.

Los días 0 y 14, se administraron por vía intraperitoneal a ratones 50 µg de OVA (Grado V; Sigma-Aldrich) y 1 mg de adyuvante de sulfato de aluminio y potasio (Sigma-Aldrich). Después de 14 días, a los ratones se les administró por vía oral 50 mg de OVA (Grado III; Sigma-Aldrich) 5 veces a intervalos de 2 días. Los ratones estuvieron en ayunas durante aproximadamente 4 a 5 horas antes de la administración oral de OVA. La aparición de diarrea se evaluó monitorizando a los ratones durante hasta 1 hora después de la inoculación de OVA. *B. longum* se liofilizó y se mezcló con alimento en polvo para ratones a 3 10<sup>9</sup> ufc/g. A los ratones se les permitió acceso *ad libitum* al alimento. Para mantener la frescura, el alimento para ratones mezclado con *B. longum* se reemplazó cada 2 o 3 días.

Histología

El yeyuno del intestino delgado se fijó con paraformaldehído al 4 % y se incluyó en parafina para formar un bloque. Luego, se produjo un portaobjetos de corte en parafina. El portaobjetos se desparafinizó y los mastocitos se tiñeron con un kit de cloroacetato esterasa de naftol AS-D (Sigma-Aldrich). Para las células caliciformes, el portaobjetos se tiñó con un kit de tinción con ácido peryódico de Schiff (ScyTek Laboratories, Inc.). Se tomó una imagen del portaobjetos teñido usando Panoramic MIDI (3D HISTECH Ltd.).

ELISA

Se usaron el kit ELISA de IgE total de ratón (BioLegend) y el kit ELISA MCPT-1 (Invitrogen) según el protocolo del fabricante para medir las concentraciones totales de IgE y MCPT-1 en suero de ratón. Para medir la IgE libre, la placa se recubrió con 1 mg/mL de IgE<sub>TRAP</sub> y se dejó reaccionar durante la noche a 4 °C. El resto del análisis se realizó según el protocolo del fabricante para el kit Mouse Total IgE ELISA.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los datos se realizó usando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.). Se usó el análisis de la curva de supervivencia de Kaplan-Meier con ensayo de rango logarítmico (Mantel-Cox) para calcular la aparición de diarrea. Se usó ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls para identificar diferencias significativas en la prueba.

I. Preparación y caracterización de IgE<sub>TRAP</sub>.

Ejemplo 1. Preparación de polipéptido que contiene FcεRIα-ECD y región Fc modificada

Se preparó un polipéptido C-terminal modificado del dominio extracelular (FcεRIα-ECD) de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE según el método descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 7,867,491.

En primer lugar, se preparó una proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de la cadena α de FcεRI que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y la inmunoglobulina Fc modificada de SEQ ID NO: 2. Específicamente, para expresar una proteína (FcεRIαECD-Fc1), una proteína (FcεRIαECD-Fc2) y una proteína (FcεRIαECD-Fc3), que estaban unidas, respectivamente, mediante una bisagra de SEQ ID NO: 19, una bisagra de SEQ ID NO: 3 y una bisagra de SEQ ID NO: 4, se clonaron casetes obtenidos uniendo el gen que codifica cada proteína en los vectores pAD15 (Genexin, Inc.) para construir vectores de expresión de proteínas FcεRIαECD-Fc. Luego, cada uno de los vectores de expresión se transdujo en células CHO DG44 (del Dr. Chasin, Columbia University, EE. UU.).

Aquí, en el momento de ser transducido en la línea celular, se transdujo simultáneamente un vector de expresión obtenido clonando un gen de transferasa del ácido α-2,6-sialico en el vector pCI Hygro (Invitrogen) para preparar por separado líneas celulares que eran capaces de expresar las proteínas FcεRIαECD-Fc2ST y FcεRIαECD-Fc3 ST a las que se agregó ácido siálico.

Como procedimiento de selección principal, la selección de HT se llevó a cabo usando medio dFBS al 10 % libre de 5-hidroxitriptamina (HT) (Gibco, EE. UU., 30067-334), medio MEMα (Gibco, 12561, EE. UU., Cat No. 12561-049) y medio HT+ (Gibco, EE. UU., 11067-030). Luego, se realizó la amplificación con metotrexato (MTX) usando clones seleccionados por HT para amplificar la productividad usando el sistema dihidrofolato reductasa (DHFR).

Después de completar la amplificación de MTX, se llevó a cabo un subcultivo aproximadamente de 1 a 5 veces para la estabilización celular con el fin de evaluar la productividad. Posteriormente, se realizó una evaluación de la productividad unitaria de las células amplificadas con MTX. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

[Tabla 1]

Versión	Medios	Concentración de MTX	Productividad		
			Cultivo de 3 días		Cultivo discontinuo (mg/ml)
			ug/mL	ug/10 <sup>6</sup> células	
FcεRIαECD-Fc2	DHFR ex-célula	500nM	37.23	20.9	223
FcεRIαECD-Fc2 α2,6-ST		100nM	45.4	25.1	338.2
FcεRIαECD-Fc3		2uM	27.0	16.9	180.4
FcεRIαECD-Fc3 α2,6-ST		1uM	17.5	10.2	101.7

- 5 Como se muestra en la tabla 1, la línea celular FcεRIαECD-Fc3 exhibió una productividad de 16.9 ug/10<sup>6</sup> células después de la amplificación con metotrexato a 2 uM. Por otro lado, la línea celular FcεRIαECD-Fc3 (FcεRIαECD-Fc3ST) cotransducida con 2,6-transferasa de ácido siálico exhibió una productividad de 17.5 ug/10<sup>6</sup> células después de la amplificación con metotrexato a 1 uM. Además, la línea celular FcεRIαECD-Fc2 exhibió una productividad de 20.9 ug/10<sup>6</sup> células en las condiciones de amplificación con metotrexato a 0.5 uM. Además, la línea celular FcεRIαECD-Fc2 (FcεRIαECD-Fc2ST) cotransducida con 2,6-transferasa de ácido siálico mostró una productividad de 25.1 ug/10<sup>6</sup> células después de la amplificación con metotrexato a 0.1 uM. Es decir, se identificó que la línea celular FcεRIαECD-Fc2 cotransfectada con 2,6-ácido siálico transferasa, que había sido seleccionada bajo las condiciones de amplificación con metotrexato a 0.1 uM, exhibía la productividad más excelente.

Ejemplo 2. Purificación de la proteína de fusión FcεRIα ECD e identificación de su pureza

- 15 Entre las líneas celulares seleccionadas en el ejemplo 1 anterior, i) FcεRIαECD-Fc3, ii) FcεRIαECD-Fc3 ST, y iii) FcεRIαECD-Fc2ST se cultivaron a una escala de 60 ml mediante un método de cultivo por lotes. Los cultivos resultantes se purificaron usando una columna de afinidad de proteína A y luego las proteínas purificadas se sometieron a SDS-PAGE y HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC) para identificar la pureza de las proteínas.

- 20 Como se muestra en las figuras 3A y 3B, se identificó que todas las proteínas respectivas purificadas mediante el método SE-HPLC tienen una pureza del 93 % o superior. Además, como resultado del análisis SDS-PAGE, se identificó que se detectaron proteínas que tenían tamaños de aproximadamente 150 kDa y aproximadamente 75 kDa, respectivamente, en las condiciones no reductoras y reductoras (Figura 3A, Carriles 1 a 6). A partir de esto se descubrió que el FcεRIαECD unido a Fc forma un dímero. Además, no se observaron impurezas tales como una forma truncada en los resultados de SDS-PAGE. En particular, incluso después del procedimiento de descongelación/congelación (Figura 3A, Carriles 7 a 9), se identificó que todas las proteínas tienen una pureza del 93 % o superior y no tienen impurezas. Aquí, se realizó Gel-IEF bajo las siguientes condiciones de prueba para identificar un grado de contenido de ácido siálico en las proteínas después de la introducción de la transferasa de ácido siálico. A partir de esto, se identificó que el contenido de proteínas ácidas aumentaba debido al mayor contenido de ácido siálico.

[Tabla 2]

Condiciones de la prueba	
Gel	pH 3-10 gel IEF 1.0 mm
Solución reguladora de la muestra	Solución reguladora de la muestra IEF (2X)
Condición de carga	100 V 1 h, 200 V 1 h, 500 V 2 h

- 30 Para identificar la reproducibilidad del rendimiento de la purificación, la línea celular FcεRIαECD-Fc2ST se cultivó por lotes en un matraz de 1 L a una escala de 250 ml y se purificó usando una columna de afinidad de proteína A. Posteriormente, el sobrenadante del cultivo y el producto purificado se sometieron a funcionamiento en un gel TGX™ del 4 % al 15 % (Bio-Rad Laboratories, Inc.) durante 30 minutos en una condición de solución reguladora Tris-Glicina SDS (TGS) y 200 V y luego sometido a análisis SDS PAGE. Como resultado, se identificó que las proteínas con una pureza muy alta (98 % o superior) se purificaron incluso con solo la primera etapa de purificación y las proteínas se expresaron con una pureza muy alta incluso en el sobrenadante del cultivo. Esto indica que las etapas de desarrollo del procedimiento se pueden simplificar al desarrollar la proteína FcεRIαECD-Fc, que se expresó en la línea celular en cuestión, en un producto médico y, como resultado, es muy probable que el coste de desarrollo del producto médico se reducirá notablemente.

- 40 Ejemplo experimental 1. Identificación de la capacidad de unión de la proteína de fusión FcεRIαECD a IgE

Se midió comparativamente la capacidad de unión a IgE para las cuatro proteínas, i) FcεRIαECD-Fc2, ii) FcεRIαECD-Fc2ST, iii) FcεRIαECD-Fc3 y iv) FcεRIαECD-Fc3ST que se había purificado mediante el método del ejemplo 2 anterior, y el anticuerpo anti-IgE disponible comercialmente, el omalizumab (nombre comercial: Xolair). Específicamente, la capacidad de unión a IgE se midió recubriendo IgE en el canal del chip sensor Protein GLC (Bio-Rad Laboratories, Inc.) y haciendo que el omalizumab o cada proteína FcεRIαECD-Fc en diversas concentraciones fluyeran a un caudal de 30 μl por minuto.

Los experimentos se realizaron identificando la base cero usando NaOH 25 mM como solución reguladora de regeneración y luego repitiendo las etapas anteriores. Posteriormente, se identificó una curva de unión usando un analizador de unión a proteínas (ProteOn XPR36, Bio-Rad Laboratories, Inc., EE. UU.). Los resultados se muestran en la tabla 3 y en las figuras 7 y 8. IgE<sub>TRAP</sub> en la figura 8 significa FcεRIαECD-Fc2ST, que es un ejemplo del polipéptido con capacidad de unión a IgE.

[Tabla 3]

Elementos de muestra		FcεRIα ECD-Fc	Omalizumab	Observaciones	
Tipo de fármaco		Proteína de fusión Fc	Anti-IgE Ab		
Afinidad de unión	ka (tasa de asociación)	Fc2	$2.14 \times 10^7$	$4.05 \times 10^7$	1.9 veces más débil que omalizumab
		Fc2ST	$2.64 \times 10^7$		1.5 veces más débil que omalizumab
		Fc3	$1.98 \times 10^7$		2.0 veces más débil que omalizumab
		Fc3ST	$2.40 \times 10^7$		1.7 veces más débil que omalizumab
	kd (tasa de disociación)	Fc2	$8.29 \times 10^{-5}$	$6.02 \times 10^{-7}$	73 veces mejor que omalizumab
		Fc2ST	$5.69 \times 10^{-5}$		106 veces mejor que omalizumab
		Fc3	$1.33 \times 10^{-4}$		45 veces mejor que omalizumab
		Fc3ST	$1.49 \times 10^{-4}$		40 veces mejor que omalizumab
	KD (kd/ka)	Fc2	$3.88 \times 10^{-12}$	$1.49 \times 10^{-9}$	38 veces mejor que omalizumab
		Fc2ST	$2.16 \times 10^{-12}$		69 veces mejor que omalizumab
		Fc3	$6.72 \times 10^{-12}$		22 veces mejor que omalizumab
		Fc3ST	$6.21 \times 10^{-12}$		24 veces mejor que omalizumab

Como se muestra en la tabla 3, se midió que el valor de la tasa de asociación (ka) del dímero de polipéptido según un ejemplo era de 1.5 a 2.0 veces menor que el del omalizumab. Es decir, se encontró que su capacidad de unión a sustancias distintas de la IgE era de 1.5 a 2.0 veces menor que la del omalizumab. Además, se midió que el valor de la tasa de disociación (kd) del dímero de polipéptido de ejemplo era de 40 a 106 veces mayor que el del omalizumab. Además, como se muestra en las figuras 7 y 8, se pudo identificar que el omalizumab perdió su unión a IgE en el caso de que ha pasado un cierto período de tiempo después de la unión, mientras que una vez que el dímero de polipéptido de la proteína de fusión FcεRIαECD se une a IgE, el dímero de polipéptido no se separó de la IgE. Es decir, se puede observar que el dímero de polipéptido no se separa fácilmente de la IgE y tiene una capacidad mucho mejor para mantener su estado unido que el omalizumab. Como resultado, se descubrió que el dímero de polipéptido de ejemplo tiene un valor de constante de disociación de equilibrio (KD <kd/ka>) que era de 22 a 69 veces mayor que el del omalizumab.

A partir de esto, se puede observar que la proteína de fusión FcεRIαECD tiene una capacidad de unión notablemente aumentada a IgE en comparación con el omalizumab. En particular, se identificó que el FcεRIαECD-Fc2 (FcεRIαECD-Fc2ST) al que se agregó ácido siálico exhibe la mayor capacidad de unión a IgE, que era 69 veces mayor que la del omalizumab. En particular, para FcεRIαECD-Fc2ST, la tasa de asociación (Ka) y la tasa de disociación (Kd) de IgE<sub>TRAP</sub> fueron aproximadamente 1.5 veces y 94.5 veces más bajas que omalizumab, respectivamente (Figuras 7 y 8, y Tabla 4). Anteriormente se informó que la IgE se disociaba muy lentamente del FcεRIα. Se identificó que IgE<sub>TRAP</sub> también se disociaba muy lentamente (Figura 8). Como resultado, la capacidad de unión de IgE<sub>TRAP</sub> a IgE humana fue 69 veces mayor que la del omalizumab (Figura 8 y Tabla 4).

[Tabla 4]

	Ka (M <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup> )	Kd (S <sup>-1</sup> )	KD (M)
IgE <sub>TRAP</sub>	$2.64 \times 10^7$	$5.69 \times 10^{-5}$	$2.15 \times 10^{-12}$
Omalizumab	$4.05 \times 10^7$	$6.02 \times 10^{-7}$	$1.49 \times 10^{-9}$
Comparación de KD [Omalizumab/IgE <sub>TRAP</sub> ]			Aproximadamente 69 veces

Ejemplo experimental 2. Identificación de la capacidad de unión de IgE<sub>TRAP</sub> a receptores de IgG mediados por IgG

IgE<sub>TRAP</sub> no se une a receptores de IgG de baja afinidad asociados con la anafilaxia mediada por IgG. Dado que se esperaba que la anafilaxia, un efecto secundario importante del omalizumab, fuera causada por la posibilidad de unirse a un receptor de IgG de baja afinidad, se usó el ensayo BLI para comprobar la capacidad de unión de IgE<sub>TRAP</sub> a los receptores de IgG mientras se usaba el omalizumab como control. Específicamente, se identificó un grado de unión de IgE<sub>TRAP</sub> y el omalizumab a los receptores de IgG usando el sistema Octet RED384 (Pall ForteBio, CA, EE. UU.).

Las proteínas recombinantes FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA y FcγRIIIB (R & D Systems Inc., 5 µg/ml) que se habían diluido en solución reguladora acetato 300 mM (pH 5) se inmovilizaron en el biosensor Amine Reactive 2 Generation (AR2G) activado por una combinación de EDC 400 mM y sulfo-NHS 10 mM. Luego, se midió la asociación y la disociación de IgE<sub>TRAP</sub> y el omalizumab en diversas concentraciones, respectivamente, durante 300 segundos. En este caso, la solución reguladora cinética usada fue PBS que contenía 0.1 % de Tween-20 y 1 % de suero bovino, y todos los experimentos se llevaron a cabo a 30 °C con un agitador de placas de muestra a una velocidad de 1,000 rpm.

Como se esperaba, el omalizumab mostró una capacidad de unión significativa a FcγRI, un receptor de IgG de alta afinidad, así como a receptores de IgG de baja afinidad tales como FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA y FcγRIIIB (Figuras 9 a 14). Esto significa que, a diferencia del omalizumab, IgE<sub>TRAP</sub> no puede unirse a receptores de IgG tales como FcγRIIA y FcγRIIB y, de este modo, tiene un riesgo muy bajo de inducir anafilaxia mediada por IgG (Figuras 9 a 14). Las capacidades de unión del omalizumab e IgE<sub>TRAP</sub> a los receptores de IgG se cuantificaron y se muestran en la figura 14.

Ejemplo experimental 3. Identificación de la actividad de la proteína de fusión FcεRIα ECD mediante ensayo de beta-hexosaminidasa en mastocitos derivados de médula ósea de ratón

Se realizó un ensayo de beta-hexosaminidasa para el análisis de la actividad *in vitro* de la proteína de fusión FcεRIαECD. Específicamente, se mezcló una proteína FcεRIαECD-Fc2 de ejemplo, en cada concentración, con IgE de ratón (1 µg/mL) y se incubó a temperatura ambiente (20 °C) durante 30 minutos para preparar muestras. Los mastocitos derivados de médula ósea de ratón en cultivo para la activación de los mastocitos se lavaron con solución reguladora de solución salina equilibrada de Hank (HBSS) para eliminar el medio y se midió el número de células. Luego, se hizo un ajuste para que se inyectaran 5 x 10<sup>5</sup> células en 40 µL de solución reguladora HBSS.

Luego, se agregaron 50 µL de la solución de muestra preparada mediante la preincubación a los mastocitos activados. Luego, el resultado se incubó en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C, durante 30 minutos. Posteriormente, tras la adición de cada 10 µL de DNP (2,4-dinitrofenol, 100 ng/mL), que es un antígeno extraño, se realizó nuevamente la incubación a 37 °C, durante 30 minutos en CO<sub>2</sub> al 5 %, y luego se separaron 30 µL del sobrenadante. Se mezclaron bien 30 µL del sobrenadante separado y 30 µL del sustrato (4-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosaminida, 5.84 mM) y luego se incubaron a 37 °C, durante 20 minutos en CO<sub>2</sub> al 5 %. Luego, se agregaron 140 µL de solución reguladora de carbonato de sodio 0.1 M (pH 10) como solución de parada para terminar la reacción. Posteriormente, se midió la absorbancia a 405 nm para identificar la cantidad de secreción de β-hexosaminidasa secretada por el antígeno extraño en los mastocitos activados. Los resultados se muestran en la figura 15A.

IgE<sub>TRAP</sub> inhibió la desgranulación de los mastocitos de una manera dependiente de la dosis con 0.45 µg/ml de IC<sub>50</sub> (concentración de fármaco necesaria para mostrar el efecto inhibitor del 50 %) en presencia de 1 µg/ml de IgE de ratón (Figura 15A). IgE<sub>TRAP</sub> inhibió completamente la desgranulación de los mastocitos derivados de la médula ósea en una proporción molecular de IgE:IgE<sub>TRAP</sub> de 0.79 (Tabla 5).

[Tabla 5]

Anti-DNP IgE	1 µg/mL (= 5.25 nM)							
IgE <sub>TRAP</sub> (µg/mL)	0	0.016	0.063	0.25	0.9	1	3	4
IgE <sub>TRAP</sub> (nM)	0	0.11	0.42	1.67	3.33	6.67	13.3	26.7
(IgE/IgE <sub>TRAP</sub> ) relación molar	0	47.8	12.5	3.15	1.58	0.79	0.40	0.20
Proporción de inhibición promedio (%)	0	2.12	12.4	13.8	49.4	99.3	99.4	99.8

Específicamente, como se muestra en la figura 15A, el dímero de polipéptido de ejemplo exhibió una proporción de inhibición de los mastocitos de aproximadamente 49.4 % en el caso de tener la mitad (0.5 µg/mL) de la concentración de IgE de ratón, y exhibió una proporción de inhibición de los mastocitos de aproximadamente 99.4 % en el caso de tener la misma concentración (1 µg/mL) de IgE de ratón. Es decir, se puede observar que la actividad inducida por IgE de los mastocitos derivados de la médula ósea se suprime en gran medida mediante el dímero del polipéptido FcεRIα-ECD de la presente invención.

Ejemplo experimental 4. Comparación de la actividad de la proteína de fusión FcεRIαECD y el anticuerpo anti-IgE humano usando el ensayo de β-hexosaminidasa en mastocitos derivados de médula ósea que expresan FcεRI humano

Se realizó un ensayo de β-hexosaminidasa para identificar la superioridad de la proteína de fusión FcεRIαECD en relación con Xolair mediante un análisis de actividad *in vitro*. Los fármacos respectivos, FcεRIαECD-Fc2ST (IgE<sub>TRAP</sub>)

y Xolair, se prepararon en cada concentración y luego se mezclaron con IgE humana (1 ug/mL). Luego se realizó la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Durante la preincubación del fármaco, se introdujo un gen FcεRI humano y se prepararon mastocitos derivados y diferenciados de la médula ósea de ratón, en la que se había eliminado el gen FcεRI de ratón. Los mastocitos preparados se lavaron con solución reguladora HBSS y luego se inyectaron 5 x 10<sup>5</sup> células en 60 µL de solución reguladora HBSS. Se agregaron 20 µL de la muestra preincubada a los mastocitos preparados y luego se incubaron en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C, durante 30 minutos.

Posteriormente, después de que se agregaran 20 uL de anticuerpo anti-IgE humano (BioLegend, Cat No. 325502, 0.5 ug/mL) para inducir una reacción similar a un antígeno extraño, y luego el resultado se incubó nuevamente en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C, durante 30 minutos. Posteriormente, tras la centrifugación a 1,500 rpm a 4 °C, se separaron 30 uL del sobrenadante. Se mezclaron bien 30 uL del sobrenadante separado y 30 uL del sustrato (4-nitrofenil N-acetil-β-glucosaminida, 5.84 mM) y luego se incubaron en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C, durante 25 minutos. Luego, se agregaron 140 uL de solución reguladora carbonato de sodio 0.1 M (pH 10) para terminar la reacción.

Posteriormente, se midió la absorbancia a 405 nm para comparar las cantidades relativas de β-hexosaminidasa secretada y se identificó un efecto inhibitor de la masa celular que dependía de la concentración de cada fármaco. Los resultados se muestran en la figura 15B. Como se muestra en la figura 15B, se midió que la IC<sub>50</sub> de la proteína de fusión FcεRIαECD era de aproximadamente 11.16 ng/mL, y se midió que la IC<sub>50</sub> de la proteína Xolair era de aproximadamente 649.8 ng/mL. Por lo tanto, se identificó que la proteína de fusión FcεRIαECD tiene una capacidad inhibitor de la actividad de los mastocitos 58 veces mayor que Xolair.

Ejemplo experimental 5. Ensayo in vivo de la proteína de fusión FcεRIαECD: modelo de alergia alimentaria

Se administraron por vía intraperitoneal 50 ug de ovoalbúmina (OVA) y 1 mg de alumbre a ratones Balb/c (Orientbio Inc.) dos veces en un intervalo de 14 días para inducir la sensibilización. Posteriormente, se administraron por vía oral 50 mg de OVA cinco veces en total los días 28, 30, 32, 34 y 36, para inducir alergia alimentaria en los intestinos.

Después de administrar la OVA por vía oral dos veces, es decir, el día 31, los ratones se dividieron en tres grupos, cada uno de los cuales contenía 7 ratones. Los tres grupos divididos fueron los siguientes: el primer grupo recibió la proteína de fusión FcεRIαECD-Fc2ST en una concentración alta (200 ug), el segundo grupo recibió la proteína de fusión FcεRIαECD-Fc2ST en una concentración baja (20 ug) y el tercer grupo no recibió nada. Durante la administración oral de OVA, se identificó si la diarrea se produce debido a la inducción de alergia alimentaria. Los ratones se sacrificaron el día 37 y se analizó el número de mastocitos en el intestino delgado, la concentración de IgE en sangre y la concentración de la enzima (proteasa-1 de los mastocitos (MCPT-1)) de la desgranulación de los mastocitos en sangre en los ratones pertenecientes a cada grupo.

Como se muestra en la figura 16, se identificó que los ratones pertenecientes al grupo que recibió FcεRIαECD-Fc2ST, que es un dímero de polipéptido, en una alta concentración exhibe un efecto de alivio de la alergia alimentaria de una manera dependiente de la concentración, en comparación con los ratones pertenecientes al grupo no recibieron nada.

II. Preparación de combinación de polipéptido con capacidad de unión a IgE y probióticos e identificación de su efecto.

Ejemplo 3: Cultivo y administración de probióticos.

*L. casei* (*Lactobacillus casei*, KACC 12413), *Lc. lactis* (*Lactococcus lactis*, KACC 13877), *L. fermentum* (*Lactobacillus fermentum*, KACC 11441) y *L. rhamnosus* (*Lactobacillus rhamnosus*, KACC 11953) se inocularon en caldo MRS o medio Brain Heart Infusion (BHI) y se cultivaron en una incubadora a 37 °C (N-Biotek Cat # NB201L) durante 24 horas. Se cultivaron *L. reuteri* (*Lactobacillus reuteri*, KACC 11452) y *S. thermophiles* (*Streptococcus thermophiles*, KACC 11857) en una incubadora con agitación (N-biotek) a 37 °C y 50 rpm durante 24 horas en vista de su naturaleza aeróbica.

Los probióticos cultivados se disolvieron en un medio de liofilización que contenía 10 % de leche desnatada y 10 % de sacarosa, y se liofilizaron usando un liofilizador (Labcono). Luego, el resultante se pulverizó. Para los probióticos completos, se midió mediante dilución en serie una unidad formadora de colonias (ufc) presente por gramo.

Los probióticos liofilizados se alimentaron continuamente con 1 x 10<sup>9</sup> a 2.5 x 10<sup>9</sup> ufc por ratón usando una zonda oral a intervalos de 2 a 3 días durante el experimento. Se alimentó un control negativo con una cantidad igual de medio liofilizado.

Ejemplo 4: Preparación de una composición que comprende probióticos y polipéptido con capacidad de unión a IgE

El polipéptido con capacidad de unión a IgE que se había obtenido en el ejemplo 1 y los probióticos obtenidos en el ejemplo 3 se mezclaron para preparar una composición para tratar

Ejemplo experimental 6. Identificación del efecto de la proteína de fusión FcεRIα-Fc sobre la mejora de la alergia

Se administraron por vía intraperitoneal 50 ug de ovoalbúmina (OVA) y 1 mg de alumbre a ratones Balb/c (Orientbio Inc.) dos veces en un intervalo de 14 días para inducir la sensibilización. Posteriormente, se administraron por vía oral 50 mg de OVA cinco veces en total los días 28, 30, 32, 34 y 36, para inducir alergia alimentaria en los intestinos. Los ratones a los que se les había inducido alergia alimentaria se dividieron en cinco grupos, cada uno de los cuales contenía 7 ratones. Los cinco grupos divididos fueron los siguientes: el primer grupo recibió una proteína recombinante FcεRIαECD en una concentración alta (200 ug), el segundo grupo recibió la proteína recombinante FcεRIαECD en una concentración baja (20 ug), el tercer grupo recibió la proteína recombinante FcεRIαECD en una concentración alta (200 ug) más *B. longum*, el cuarto grupo recibió la proteína recombinante FcεRIαECD en una concentración baja (20 ug) más *B. longum*, y el quinto grupo no recibió nada.

Durante la administración oral de OVA, se identificó si la diarrea se produce debido a la inducción de alergia alimentaria. Los ratones se sacrificaron el día 37 y se analizó el número de mastocitos en el intestino delgado, la concentración de IgE en sangre y la concentración de enzima (proteasa-1 de los mastocitos (MCPT-1)) con desgranulación de mastocitos en sangre se analizaron en los ratones pertenecientes a cada grupo. Como se muestra en la figura 19B, se encontró que los ratones que pertenecen al grupo que recibió una combinación del dímero de polipéptido FcεRIαECD y *B. longum* exhiben un efecto de alivio de la alergia alimentaria en comparación con los ratones que pertenecen al grupo que no recibió nada.

Ejemplo experimental 7. Identificación del efecto de la administración combinada de IgE<sub>TRAP</sub> y probióticos sobre la mejora de la alergia

Para evaluar el efecto de IgE<sub>TRAP</sub> sobre la alergia alimentaria, se indujo diarrea aguda dependiente de la dosis en ratones BALB/c para producir un modelo de ratón con alergia alimentaria inducida por alérgenos. Específicamente, los experimentos se llevaron a cabo de la misma manera que en el ejemplo experimental 6, excepto que se administró IgE<sub>TRAP</sub>, una proteína recombinante FcεRIαECD, a 100 ug/cabeza. Además, los probióticos *B. longum* se liofilizaron y se mezclaron con alimento en polvo para ratones a 3 x 10<sup>9</sup> ufc/g. A los ratones se les permitió acceso *ad libitum* al alimento. Para mantener la frescura, el alimento para ratones mezclado con *B. longum* se reemplazó cada 2 o 3 días. Como resultado, como se muestra en la siguiente tabla 6 y en la figura 18, se descubrió que se demostró un excelente efecto de alivio de las alergias en el grupo experimental que recibió simultáneamente los probióticos *B. longum* e IgE<sub>TRAP</sub>, un dímero de polipéptido FcεRIαECD.

[Tabla 6]

Grupo	Número final de ratones	Rasgo característico	1er desafío OVA	2º desafío OVA	3er desafío OVA	4º desafío OVA	5º desafío OVA
1	17	Contr. enfermedad	0/17 (0.00%)	0/17 (0.00%)	2/17 (11.76%)	14/17 (82.35%)	15/17 (88.24%)
2	17	<i>B. longum</i> solo	0/17 (0.00%)	0/17 (0.00%)	2/17 (11.11%)	11/17 (64.71%)	11/17 (64.71%)
3	18	IgE trap + <i>B. longum</i> solo	0/18 (0.00%)	0/18 (0.00%)	1/18 (5.56%)	2/18 (11.11%)	4/18 (22.22%)
4	17	IgE trap solo	0/17 (0.00%)	0/17 (0.00%)	3/17 (17.65%)	6/17 (35.29%)	9/17 (52.94%)
5	16	Contr. normal	0/16 (0.00%)	0/16 (0.00%)	0/16 (0.00%)	0/16 (0.00%)	0/16 (0.00%)

Usando este modelo, los presentes inventores han descubierto que la administración de IgE<sub>TRAP</sub> sola disminuyó eficazmente la aparición de diarrea, y han identificado que la administración de IgE<sub>TRAP</sub> en combinación con *B. longum* disminuyó notablemente la aparición de diarrea en comparación con la administración de IgE<sub>TRAP</sub> sola (Figura 18). Se ha informado que *B. longum* disminuyó el número de mastocitos y alivió los síntomas alérgicos a los alimentos mediante la apoptosis. Sin embargo, el grupo que recibió la inyección intraperitoneal de IgE<sub>TRAP</sub> mostró un mejor efecto terapéutico que el grupo que recibió diariamente *B. longum* (Figura 18). Curiosamente, incluso en el caso donde se usó IgE<sub>TRAP</sub> con una concentración 10 veces menor, una terapia combinada de IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* exhibió un efecto similar a la terapia con IgE<sub>TRAP</sub> solo (Figura 19B).

Ejemplo experimental 8. Identificación de efectos en el momento de la administración combinada de IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum*: niveles de MCPT-1 e IgE

Además, se midió el nivel de MCPT-1 en suero para identificar la desgranulación de los mastocitos. La administración de IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* solos no disminuyó el nivel de MCPT-1, pero una combinación de IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* disminuyó significativamente el nivel de MCPT-1 (Figura 20). De este modo, se puede observar que *B. longum* e IgE<sub>TRAP</sub> cooperan para inhibir la desgranulación de los mastocitos. En un modelo de ratón alérgico a los alimentos, para investigar la eficacia de un agente terapéutico que disminuye la IgE, se usó ELISA para analizar los niveles de IgE total e IgE libre en suero. IgE<sub>TRAP</sub> y la combinación de IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* aumentaron ligeramente el nivel de IgE

total (Figura 21). Sin embargo, IgE<sub>TRAP</sub> y la combinación de IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* disminuyeron en gran medida el nivel de IgE libre (Figura 22). Por el contrario, la administración de *B. longum* sola no afectó los niveles de IgE total e IgE libre (Figuras 21 y 22). De este modo, IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* alivian los síntomas de alergia alimentaria de varias maneras, lo que sugiere que esta combinación puede ejercer un efecto terapéutico eficaz sobre la alergia alimentaria.

- 5 Ejemplo experimental 9. Identificación del efecto inhibitorio de la combinación de IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* sobre el número de mastocitos y la hiperplasia de células caliciformes.

Para investigar si IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum*, y una combinación de los mismos, disminuyen el número de mastocitos, se usó la actividad de cloroacetato esterasa para teñir los mastocitos. Los resultados mostraron que la administración de IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* solos disminuyó notablemente el número de mastocitos, y una combinación de los dos fue mucho más eficaz (Figuras 23 y 24). Se puede observar que los resultados para *B. longum* son consistentes con los reportados anteriormente. Se realizó una investigación sobre si la hiperplasia de células caliciformes inducida por el entorno de citoquinas Th2 puede inhibirse mediante IgE<sub>TRAP</sub>, *B. longum* y la terapia combinada de los mismos. Como se esperaba, se identificó que el tamaño de las células caliciformes en el intestino delgado de los ratones alérgicos a los alimentos aumentaba y que se producía hiperplasia a medida que aumentaba el número de células (Figuras 25 y 26).

Se identificó que la administración de IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* disminuyó notablemente el tamaño y el número de células caliciformes y este efecto se hizo mayor en el caso de que se administraron IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* en combinación (Figuras 25 y 26). Además, se observó que la expresión del ARNm de IL-33 tendía a disminuir con IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum*, y este efecto se volvió significativamente mayor en el caso de que se administrara en combinación (Figura 28). Estos resultados indican que IgE<sub>TRAP</sub> y *B. longum* inhiben significativamente el número de mastocitos intestinales y la hiperplasia de células caliciformes, y exhiben un efecto mejorado adicional en el caso de que se administren en combinación.

Ejemplo experimental 10. Identificación de la presencia de IgE<sub>TRAP</sub> en suero después de la administración oral de IgE<sub>TRAP</sub> a ratones

Se administró por vía oral IgE<sub>TRAP</sub> (300 ug) a ratones y, 2 horas más tarde, se extrajo el suero mediante extracción de sangre retroorbitaria. Después de dejarlo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se obtuvo el sobrenadante (suero) mediante centrifugación a 4 °C y 1,300 rpm durante 15 minutos. Se recubrió una inmunoplaaca de 96 pocillos con un anticuerpo anti-FcεRI (Abcam, ab54411) y se dejó reaccionar durante la noche a 4 °C. La placa se lavó con solución reguladora de lavado (PBS que contenía Tween-20 al 0.05 %) y luego se agregó a la misma solución reguladora de bloqueo (PBS que contenía albúmina sérica bovina al 1 %). Se dejó reaccionar la placa durante 1 hora. La placa se lavó de nuevo con la solución reguladora de lavado y se agregaron a la placa una muestra estándar y una muestra de suero de ratón diluida. Se dejó reaccionar la placa durante 2 horas y se lavó nuevamente con la solución reguladora de lavado. Se le agregó un anticuerpo Fc anti-IgG4 humano (Abcam, ab99823) y se dejó reaccionar la placa durante 1 hora. La placa se lavó nuevamente con la solución reguladora de lavado y se le agregó sustrato TMB (Supmodics). Después de dejar reaccionar durante 20 minutos mientras se bloqueaba la luz, se agregó una reacción de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M) para detener la reacción. Se midió un valor de concentración con un lector de microplacas (espectrofotómetro de microplacas Epoch) estableciendo una longitud de onda de 450 nm. Como resultado, se detectó IgE<sub>TRAP</sub> en el suero de ratones normales (Figura 35). A partir de estos resultados, se puede ver que en el caso de que se administra por vía oral una proteína IgE<sub>TRAP</sub>, la proteína IgE<sub>TRAP</sub> se libera en el suero mediante la unión con FcRn en la mucosa y, de este modo, se puede exhibir un efecto terapéutico.

Ejemplo experimental 11. Identificación del efecto obtenido mediante la administración combinada de IgE<sub>TRAP</sub> y diversos probióticos en un modelo de alergia alimentaria.

Para evaluar el efecto de IgE<sub>TRAP</sub> y los probióticos sobre la alergia alimentaria, se indujo diarrea aguda dependiente de la dosis en ratones BALB/c para producir un modelo de ratón con alergia alimentaria inducida por alérgenos. Específicamente, los experimentos se llevaron a cabo de la misma manera que en el ejemplo experimental 7, excepto que se administró intraperitonealmente IgE<sub>TRAP</sub>, una proteína recombinante FcεRIαECD, a ratones a 100 ug/cabeza como en el programa de experimentos de la figura 17. Además, se alimentaron continuamente probióticos liofilizados a razón de 1 x 10<sup>9</sup> a 2.5 x 10<sup>9</sup> ufc por ratón usando una zonda oral a intervalos de 2 a 3 días durante el experimento, y un control negativo se alimentó con una cantidad igual de medio liofilizado.

Los resultados obtenidos al identificar la frecuencia de la diarrea después de la administración de IgE<sub>TRAP</sub> y *L. casei* se ilustran en la figura 29. Los resultados obtenidos al identificar la frecuencia de diarrea después de la administración de E<sub>TRAP</sub> y *Lc. lactis* se ilustran en la figura 30. Los resultados obtenidos al identificar la frecuencia de la diarrea después de la administración de IgE<sub>TRAP</sub> y *S. thermophilus* se ilustran en la figura 31. Los resultados obtenidos al identificar la frecuencia de la diarrea después de la administración de IgE<sub>TRAP</sub> y *L. rhamnosus* se ilustran en la figura 32. Los resultados obtenidos al identificar la frecuencia de la diarrea después de la administración de IgE<sub>TRAP</sub> y *L. reuteri* se ilustraron en la figura 33. Los resultados obtenidos al identificar la frecuencia de la diarrea después de la administración de IgE<sub>TRAP</sub> y *L. fermentum* se ilustran en la figura 34.

Lista de señales de referencia

*B. longum*: *Bifidobacterium longum*

OIT: inmunoterapia oral

PSA: anafilaxia sistémica pasiva

SPR: resonancia de plasmón superficial

5 BLI: interferometría de biocapa

BMMC: mastocitos derivados de médula ósea

ufc: unidad formadora de colonias

MCPT-1: proteasa-1 de los mastocitos

OVA: ovoalbúmina

10 Célula Treg: célula T reguladora

Célula Th2: célula T auxiliar tipo 2

ILC2: célula linfoide innata del grupo 2

[Texto de lista de secuencia]

SEQ ID NO: 1

VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLTCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN SSLNIVNAKF  
EDSGEYKCQH QQVNESEPVY LEVFSDWLLL QASAEVVM EG QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY  
YKDGEALKYW YENHNISITN ATVEDSGTY Y CTGK V W Q L D Y ESEPLNITVI KAPREKYWLQ

SEQ ID NO: 2

SHTQPLGVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR  
EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNQKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P  
PSQEEMTKNQ VSLICLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPVLDS DG SFFLYSRLTV  
DKSRWQEGNV FSCSYMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK

SEQ ID NO: 3

RNTGRGGEEK KGSKEKEEQE ERETKTPECP

15

SEQ ID NO: 4

AQPQAEGSLA KATTAPATTR NTGRGGEEKK GSKEKEEQEE RETKTPECP

## ES 2 969 110 T3

### SEQ ID NO: 5

gtgccccaga ageccaaggt gagcctgaac cctccctgga acagaatctt caagggcgag aacgtgacce tgacctgcaa  
cggcaacaac ttctcgagg tgagcagcac caagtggctt cacaatggca gcctgagcga ggagaccaac agctccctga acatcgtgaa  
cgccaagttc gaggacagcg gcgagtacaa gtgccagcac cagcaggtga acgagagcga gccctgtgtac ctggaggtgt tcagcagctg  
gctgctgctg caggccagcg ccgaggtggt gatggagggc cagccoctgt tcttgagatg ccacggctgg agaaactggg acgtgtacaa  
gggatctac tacaaggatg gcgaggccct gaagtactgg tacgagaacc acaacatctc catcaccaac gccaccgtgg aggacagcgg  
cacctactac tgcacaggca aggtgtggca gctggactac gagagcgagc ccttgaacat caccgtgatc aaggctccca gagagaagta  
ctggctgcag

### SEQ ID NO: 6

tgcgtggtcg tggatgtgag ccaggaagat cccgaagtgc agttcaactg gtactgtgat ggcttggag tgcacaacgc caagaccaag  
cccagagaag agcagttcaa ctccacctac agagtggfga gcgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag  
tgcaaggtgt ccaacaagg cctgccagc tccatcgaga agaccatcag caagccaaa ggccagccca gagaaccoca ggtgtacacc  
ctgcctccca gccaggaaga gatgaccaag aaccagggtt cctfgacctg cctggtgaaa ggcttctacc ccagcgacat ccccgtggag  
tgggaaagca acggccagcc cgagaacaat tacaagacia cccctccctg gctggatagc gatggcagct tcttctgta cagcagactg  
accgtggaca agagcagatg gcaggaaggg aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgaa gccctgcaca accactacac ccagaagagc  
ctgtccctga gcctgggcaa g

### SEQ ID NO: 7

aggaacaccg gcagaggagg cgaggaaaag aaaggaagca aggagaagga ggagcaggag gaaagagaaa ccaagacccc  
cgagtgcacc agccacacc agcccctggg cgtgttctg ttcccccca agcccaagga caccctgatg atcagcagaa ccccagaggt gacc

### SEQ ID NO: 8

gcccagcccc aggccgaggg cagcctggct aaggccacca cagctccccg caccaccagg aacaccggca gaggaggcga  
ggaaaagaaa ggaagcaagg agaaggagga gcaggaggaa agagaaacca agacccccga gtgccccagc cacaccagc ccttggggt  
gttctgttc cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc agcagaaccc ccgaggtgac c

### SEQ ID NO: 9

ES 2 969 110 T3

MDAMLRGLCC VLLLCGAVFV SPSHA

SEQ ID NO: 10

aiggacgcca tgcgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg tcccctagcc acgcc

SEQ ID NO: 11

MDAMLRGLCC VLLLCGAVFV SPSHAVPQKP KVSLNPPWNR IFKGENVTLT CNGNFFFEVS  
STKWFHNGSL SEETNSSLNI VNAKFEDSGE YKCQHQVNE SEPVYLEVFS DWLLLQASAE  
VVMEGQPLFL RCHGWRNWDV YKVIYYKDGE ALKYWYENHN ISITNATVED SGTYYCTGKV  
WQLDYESEPL NITVIKAPRE KYWLQRNTGR GGEKKGSKE KEEQEERETK TPECPSHTQP  
LGVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN  
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE  
MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW  
QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 12

aiggacgcca tgcgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg tcccctagcc acgccgtgcc ccagaagecc  
aaggtagacc tgaacccicc cggaaacaga atctcaagg gcgagaacct gaccctgacc tgcaacggca acaactctt cgaggtgagc  
agcaccaaat ggttccacaa tggcagccig agcgaggaga ccaacagctc cclgaacatc gteaacgcca agtfcagga cagcggcgag  
tacaagtgcc agcaccagca ggtgaacgag agcgagcccg tctacctgga ggtgttcagc gactegctgc tgcfcagcc cagcggcgag  
gtgtgatgg agggccagcc cctgttctg agatgocacg gctggagaaa ctgggacgig tacaaggfca tctactacaa ggtatgagcag  
gccctgaagt actggtacga gaaccacaac atctecatca ccaacgccac cgtggaggac agcggcacct actactgac aggcaaggtg  
tggcagctgg actacgagag cgagccctg aacatcaccg tcatcaaggc tccagagag aagtactggc tgcagaggaa caccggcaga  
ggaggcgagg anaagaaagg aagcaaggag aaggaggagc aggaggaaaag agaaaccaag acccccagat gccccagcca caccagccc  
ctgggcgigt tctgttccc ccccaagccc aaggacacce tgatgatcag cagaaccccc gaggtgacct gcgtggtcgt ggtatgagc  
caggaagatc cgaagtgca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagaaga gcagtcaac  
tccacctaca gagtggtag cgtgctgacc gtgctgacc aggactggt gaacggcaag gactacaagt gcaagggtgc caacaaggc  
ctgccagct ccatcgagaa gaccatcagc aaagccaaag gccagcccag agaaccccag gtfacaccc tgcctccag ccaggaagag  
atgaccaaga accaggtgc cctgacctg ctggtgaaag gcttctacc cagcgacatc gccgtggagt gggaaagcaa cggccagccc  
gagaacaatt acaagacaac ccctcccgt ctggatagcg atggcagctt ctctcttac agcagactga ccgtggacaa gacagatgg

ES 2 969 110 T3

caggaaggca acgtgtfcag ctgcagcgtg atgcacgaag cctgcacaaa ccactacace cagaagagcc tctccctgag cctgggcaag

SEQ ID NO: 13

MDAMLRGLCC VLLLCGAVFV SPSHAVPQKP KVSLNPPWNR IFKGENVTLT CNGNNFFEVS  
STKWFHNGSL SEETNSSLNI VNAKFEDSGE YKCQHQQVNE SEPVYLEVFS DWLLLQASAE  
VVMEGQPLFL RCHGWRNWDV YKVIYYKDGE ALKYWYENHN ISITNATVED SGTYYCTGKV  
WQLDYESEPL NITVIKAPRE KYWLQAQPQA EGSLAKATTA PATTRNTGRG GEEKKGSKEK  
EEQEERETKT PECPSHTQPL GVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY  
VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK  
AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK

SEQ ID NO: 14

atggagccca tctgagagg cctgtctgtg gtctgtctgc tgtcggcgc cgtgtctgtg tccctagcc acgacctgcc ccagaagccc  
aaggtgagcc tgaacctcc ctggaacaga atctcaagg gcgagaacgt gacctgacc tgaacggca acaactctt cgaggtgagc  
agcaccaagt ggttcacaaa tggcagcctg agcgaggaga ccaacagctc cctgaacatc gtgaacgcc agtgcagga cagcggcgag  
tacaagtgcc agcaccagca ggtgaacgag agcgagcccg tctactgga ggtgttcagc gactggctgc tgtgcagcc cagcggcgag  
gtggtgatgg agggccagcc cctgtctctg agatgccacg gctggagaaa ctgggacgtg tacaaggtga tctactacaa ggatggcgag  
gccctgaagt actggtacga gaaccacaa acatccatca ccaacgccac cgtggaggac agcggcacct actactgcac aggcaaggtg  
tggcagctgg actacgagag cgagcccctg aacatcaccg tgaatcaaggc tcccagagag aagtactggc tgcaggccca gccccagcc  
gagggcagcc tggctaaagg caccacagct cccgccacca ccaggaacac cggcagagga ggcgaggaaa agaaaggaag caaggagaag  
gaggagcagg aggaaagaga aaccaagacc cccagatgcc ccagccacac ccagcccctg ggcgtgttcc tgttcccccc caagcccag  
gacacctga tgaatcagcag aacccccgag gtgacctcgg tggctgtgga tgtgagccag gaagatccc aagtgcagtt caactgttac  
gtggatggcg tggnaagtca caacgccaa accaagccca gagaagagca gttaactcc acctacagag tggtagcgt gctgacctg  
ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtga aggtgtccaa caaaggcctg occagctca tgcagaagac catcagcaaa  
gccaaagcc agcccagaga accccaggtg tacacctctc ctcccagcca ggaagagatg accaagaacc aggtgtccct gacctgctg  
gtgaaaggct tctaccccag cgacatgcc gtggagtggg aaagcaacgg ccagcccag aacaattaca agacaacccc tccctgtctg  
gatagcgtg gcagctctt tctgtacagc agactgaccg tggacaagag cagatggcag gaaggcaacg tgtcagctg cagcgtgatg  
cacgaagccc tgcacaacca ctacaccag aagagcctgt ccctgacctt gggcaag

ES 2 969 110 T3

SEQ ID NO: 15

MIHTNLKKKF SCCVLVLLF AVICVWKEKK KGSYYDSFKL QTKEFQVLKS LGKLAMGSDS  
QSVSSSTQD PHRGRQTLGS LRGLAKAKPE ASFQVWNKDS SSKNLIPRLQ KIWKNYLSMN  
KYKVS YKGP GPG PGIKFSAEAL RCHLRDHVNV SMVEVTDFFP NTSEWEGYLP KESIRTKAGP  
WGRCAVVSSA GSLKSSQLGR EIDDHDAVLR FNGAPTANFQ QDVGTKTIR LMNSQLVTTE  
KRFLKDSLYN EGILIVWDPS VYHSDIPKWY QNPDYNFFNN YKTYRKLHPN QPFYILKPQM  
PWELWDILQE ISPEEQPNP PSSGMLGIII MMTLCDQVDI YEFLPSKRKT DVCYYYQKFF  
DSACTMGAYH PLYEKNLVK HLNQGTDEDI YLLGKATLPG FRTIHC

SEQ ID NO: 16

atgatccaca ccaacctgaa gaagaagttc agctgctgog tctgtgtgtt cctgctgttc gccgtgatct gctgtgtgaa ggagaagaag  
aaagccagct actacgacag ctcaagctg cagaccaagg agtccaggt gctgaagagc ctggccaagc tggccatggg cagcgacagc  
cagagcgtgt ccagctctc caccaggat ccccacagag gcagacagac cctgggcage ctgagaggcc tggccaaggc caagcccag  
gccagctcc aggtgtgaa caaggacagc agcagcaaga acctgatcc cagactgag aagatctgga agaactacct gagcatgac  
aagfacaagg tgagctaaa aggacccgga ccggcatca agtccagcgc cgaggccctg aggtgccacc tgagagacca cgtgaacctg  
agcatggtg aagtaccga ctccccctc aacaccagc agtgggaagg ctacctgcc aaggagagca tcaggaccaa ggctggcccc  
tggggcagat gcgccgtgt gagcagcgtt ggcagcctga agagctccca gctgggcaga gagatgacg accacgatgc cgtgctgagg  
ttcaatggcg ctcccaccgc caactccag caggacgtgg gcaccaagac cacaatccgg ctgatgaaca gccagctgtt gacaaccgag  
aagcgttcc tgaaggacag cctgtacaac gaggcatcc tgatgtgtg ggatcccage gtgtaccaca ggcacatccc caagtggtac  
cagaatccc actacaact ctcaacaac tacaagaact atagaaagct gcacccaac cagccctct acatccigaa gccccagatg ccttgggagc  
tgtggacat cctgcaggag atcagccctg aagagatcca gcccaacct cctccagcg gcatgctggg cattatcic atgatgacc tgtgcacca  
ggtggacatc tacgattcc tgcaccgaa gagaagacc gactgtgtct actactaica gaagttctc gacagcctt gcacatggg cgcctaccac  
ccccgtgt acgagaaga cctggtgaag cactgaacc agggcacca cgaggacatc tactgtgtg gcaagccac cctgcccgcc  
ttcagaacca tccactgc

SEQ ID NO: 17

RNTGRGEEK KXXKEKEEQE ERETKTPECP

SEQ ID NO: 18

AQPQAEGSLA KATTAPATTR NTGRGEEKK XXKEKEEQEE RETKTPECP

ES 2 969 110 T3

SEQ ID NO: 19

RNTGRGGEEK KKEKEKEEQE ERETKTPECP

SEQ ID NO: 20

VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLTCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN SSLNIVNAKF  
EDSGEYKCQH QQVNESEPVY LEVFSDWLLL QASAEVVMEG QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY  
YKDGEALKYW YENHNISITN ATVEDSGTYT CTGKVVQLDY ESEPLNITVI KAPREKYWLQ  
RNTGRGGEEK KKEKEKEEQE ERETKTPECP SHTQPLGVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV  
VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK  
VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P SQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE  
SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK

SEQ ID NO: 21

VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLTCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN SSLNIVNAKF  
EDSGEYKCQH QQVNESEPVY LEVFSDWLLL QASAEVVMEG QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY  
YKDGEALKYW YENHNISITN ATVEDSGTYT CTGKVVQLDY ESEPLNITVI KAPREKYWLQ  
RNTGRGGEEK KGSKEKEEQE ERETKTPECP SHTQPLGVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV  
VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK  
VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P SQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE  
SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK

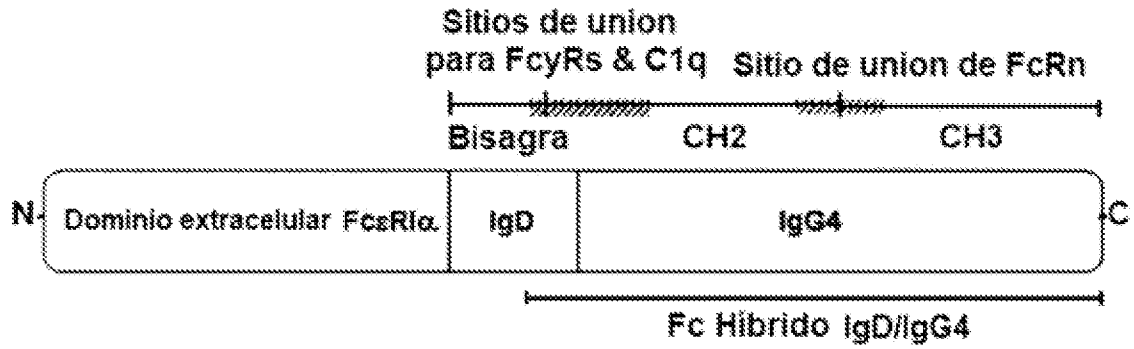
SEQ ID NO: 22

VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLTCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN SSLNIVNAKF  
EDSGEYKCQH QQVNESEPVY LEVFSDWLLL QASAEVVMEG QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY  
YKDGEALKYW YENHNISITN ATVEDSGTYT CTGKVVQLDY ESEPLNITVI KAPREKYWLQ  
AQPQAEGLA KATTAPATTR NTGRGGEEKK GSKEKEEQEE RETKTPECP S HTQPLGVFLF  
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV  
SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV  
SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TTPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF  
SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK

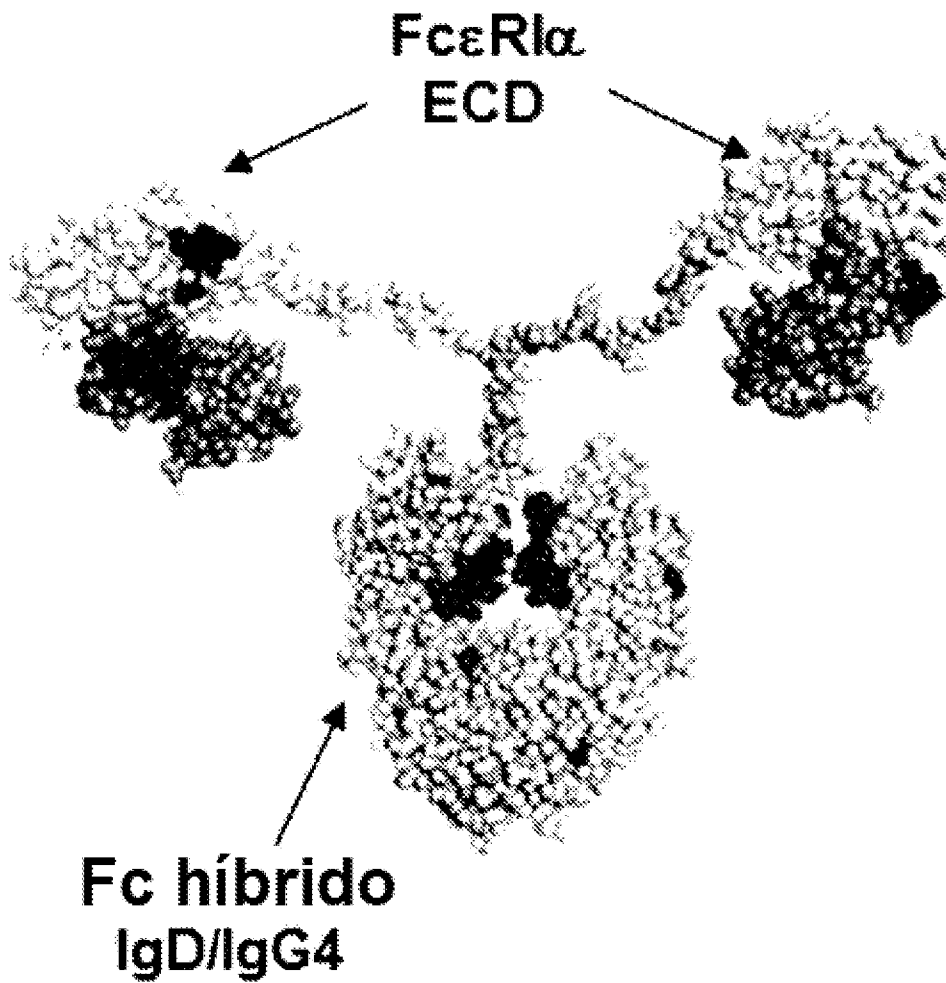
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende como ingredientes activos:  
probióticos; y  
un polipéptido con capacidad de unión a IgE,
- 5 en la que el polipéptido con capacidad de unión a IgE es una proteína recombinante que es un dímero de polipéptido que contiene dos monómeros, cada uno de los cuales comprende un dominio extracelular de una subunidad alfa de un receptor Fc de IgE (FcεRIαECD),  
el monómero contiene una región Fc modificada, en el que la región Fc modificada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y
- 10 la región Fc modificada y el FcεRIαECD están unidos mediante un enlazante.
2. La composición según la reivindicación 1,  
en la que los probióticos son bacterias ácido lácticas o Bifidobacterium, opcionalmente  
en la que las bacterias ácido lácticas son una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*.
- 15 3. La composición según la reivindicación 2,  
en la que el *Lactobacillus* es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus* y *L. salivarius*, el *Lactococcus* es *Lc. lactis*, y el *Streptococcus* es *S. thermophilus*.
- 20 4. La composición según la reivindicación 2, en la que la Bifidobacterium es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* y *B. animalis ssp. lactis*.
5. La composición según la reivindicación 2, en la que los probióticos son *L. casei* o *B. longum*.
6. La composición según la reivindicación 1, en la que el dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor Fc de IgE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
7. La composición según la reivindicación 1, en la que los probióticos están en forma de polvo seco.
- 25 8. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica, en la que la composición farmacéutica comprende: la composición según la reivindicación 1.
9. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en la que la enfermedad alérgica es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en alergia alimentaria, dermatitis atópica, asma, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica, urticaria idiopática crónica, y dermatitis alérgica de contacto.
- 30 10. Una composición de alimento funcional para la salud para su uso en la mejora o alivio de un síntoma alérgico, en la que la composición de alimento funcional para la salud comprende: la composición según la reivindicación 1.
11. Un kit para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica, que comprende: una primera composición que contiene probióticos; y  
una segunda composición que contiene un polipéptido con capacidad de unión a IgE, en la que el polipéptido con capacidad de unión a IgE es una proteína recombinante que es un dímero de polipéptido que contiene dos monómeros,  
35 cada uno de los cuales comprende un dominio extracelular de una subunidad alfa de un receptor Fc de IgE (FcεRIαECD),  
el monómero contiene una región Fc modificada, en el que la región Fc modificada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y
- 40 la región Fc modificada y el FcεRIαECD están unidos mediante un enlazante,  
en el que la segunda composición es una composición para administración subcutánea o intravenosa.

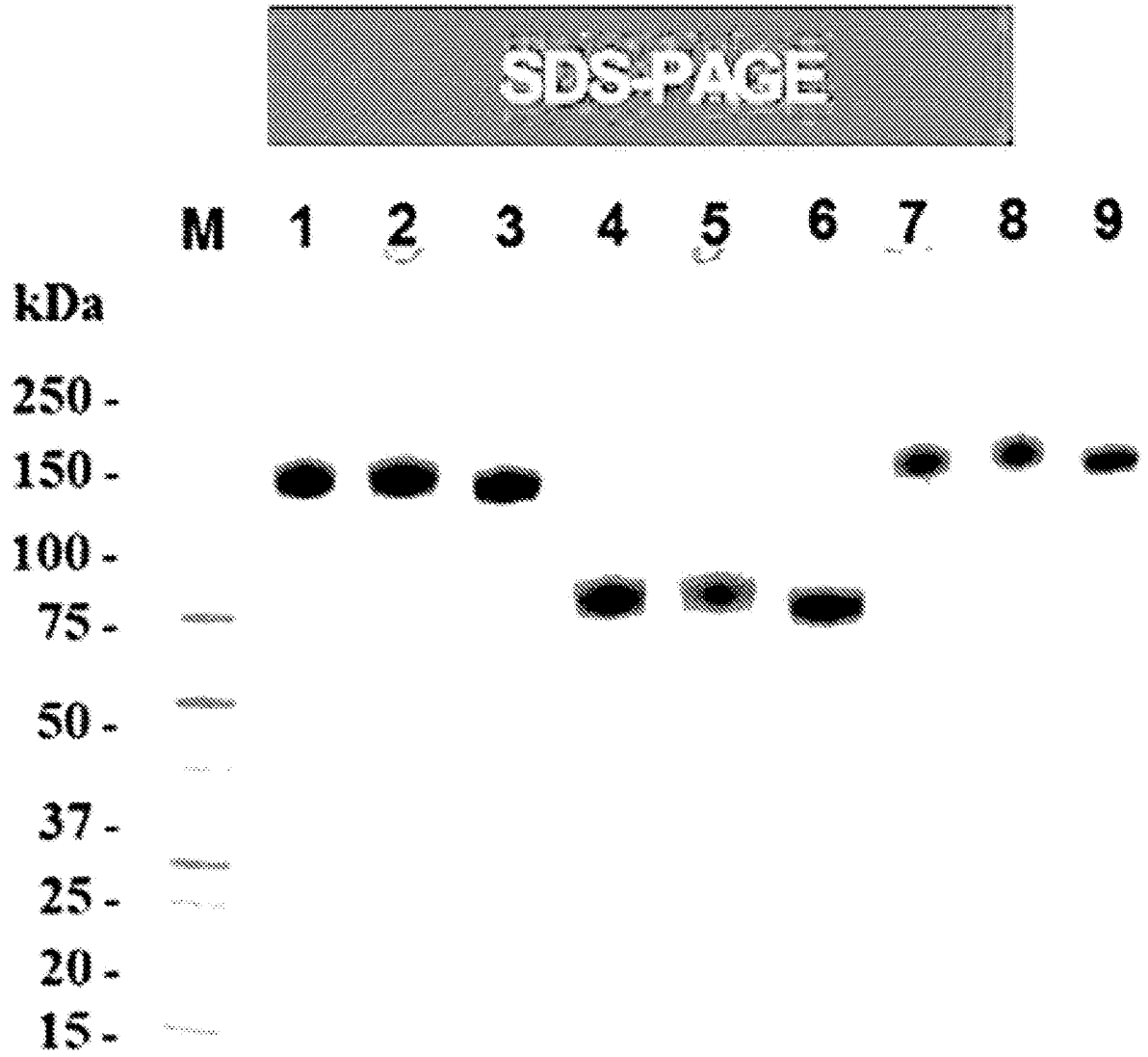
[FIG. 1]



[FIG. 2]



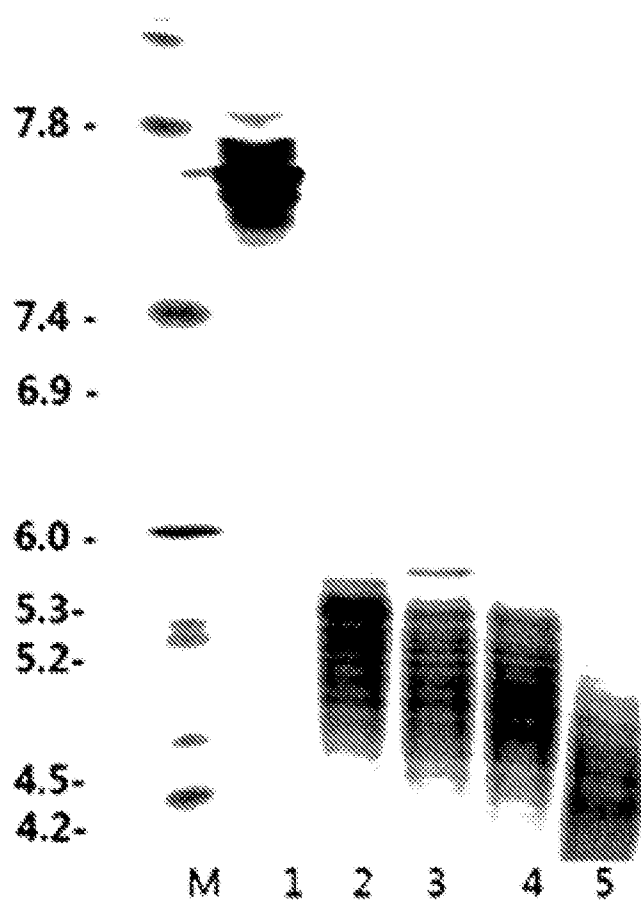
[FIG. 3A]



[FIG. 3B]

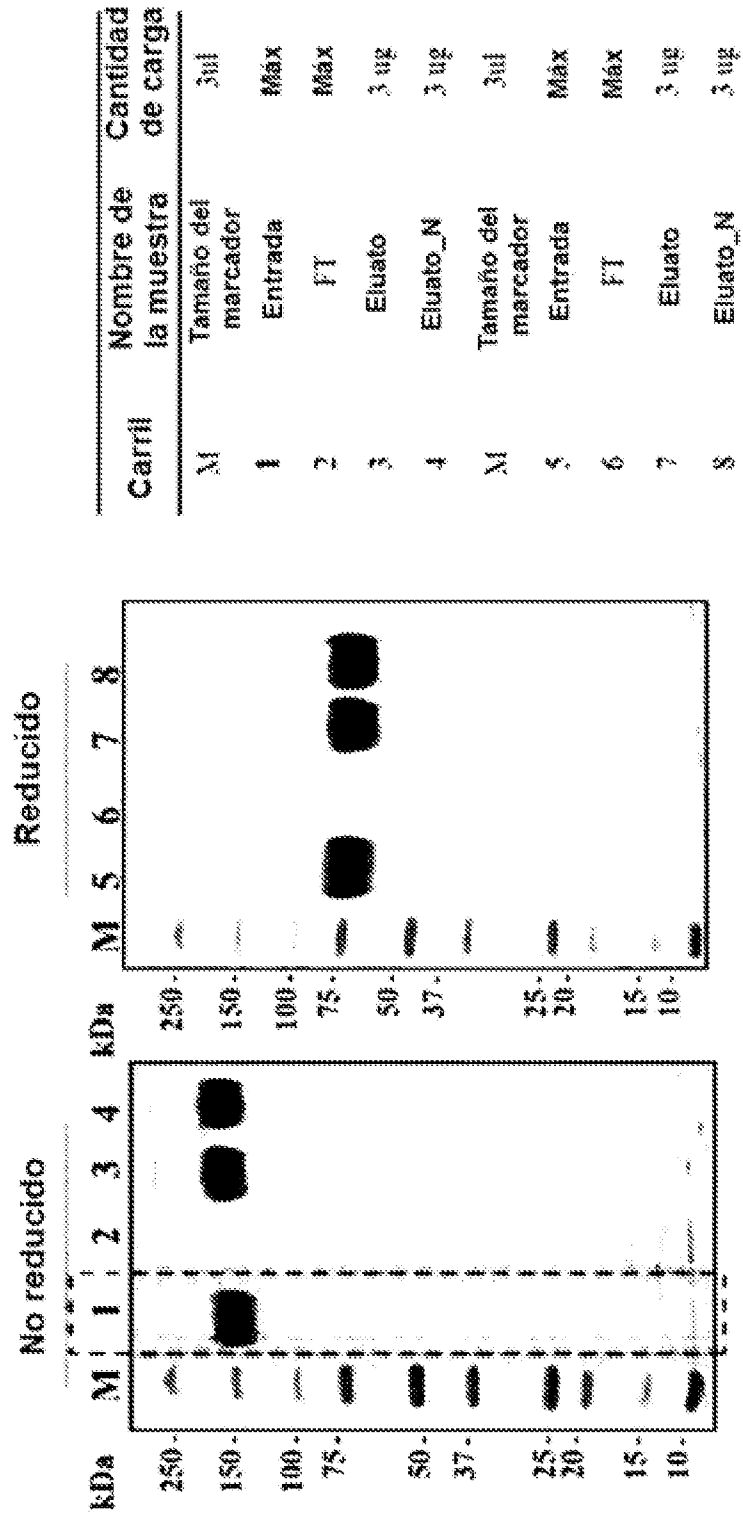
Carril #	Muestra	Purificación	Pureza (SE-HPLC)	Condición de la muestra	
M	Estándar de proteína		.	.	.
1	FcεR1α ECD-Fc3	Purificación de una etapa (columna proteína A)	94.5%	.	Sin reducción
2	FcεR1α ECD-Fc3+2,6 ST		93.7%		
3	FcεR1α ECD-Fc2+2,6 ST		93.2%		
4	FcεR1α ECD-Fc3		94.5%	.	Reducción
5	FcεR1α ECD-Fc3+2,6 ST		93.7%		
6	FcεR1α ECD-Fc2+2,6 ST		93.2%		
7	FcεR1α ECD-Fc3		94.5%	Prueba de congelación y descongelación	Sin reducción
8	FcεR1α ECD-Fc3+2,6 ST		93.7%		
9	FcεR1α ECD-Fc2+2,6 ST		93.2%		

[FIG. 4]

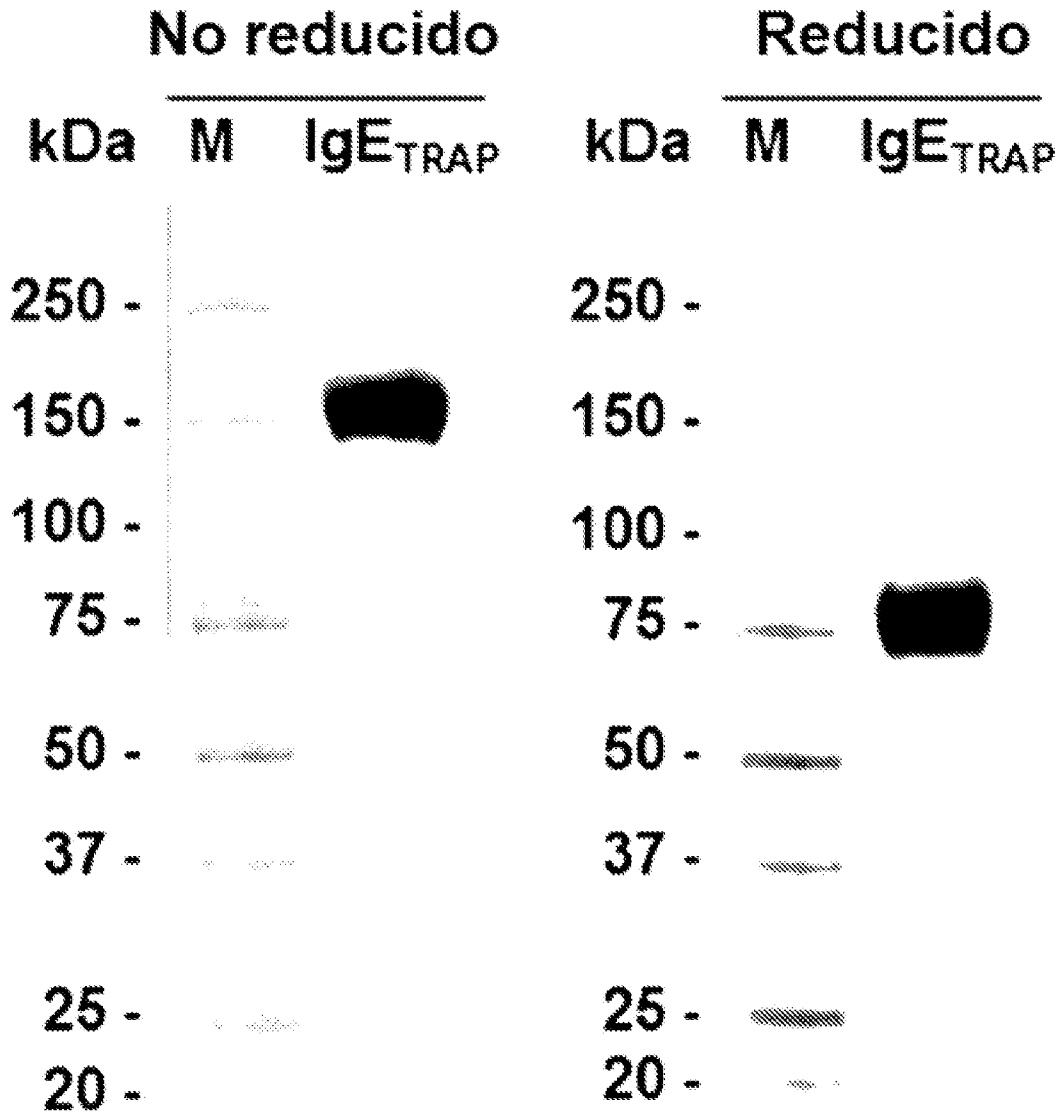


Carril	Muestra de carga	PI teórico
M	Marcador (SERVA pH3-10, 5uL)	
1	Xolair	7.03
2	FceRI $\alpha$ ECD-FC2	5.62
3	FceRI $\alpha$ ECD-FC2+2,6 ST	5.62
4	FceRI $\alpha$ ECD-FC3	5.63
5	FceRI $\alpha$ ECD-FC3+2,6 ST	5.63

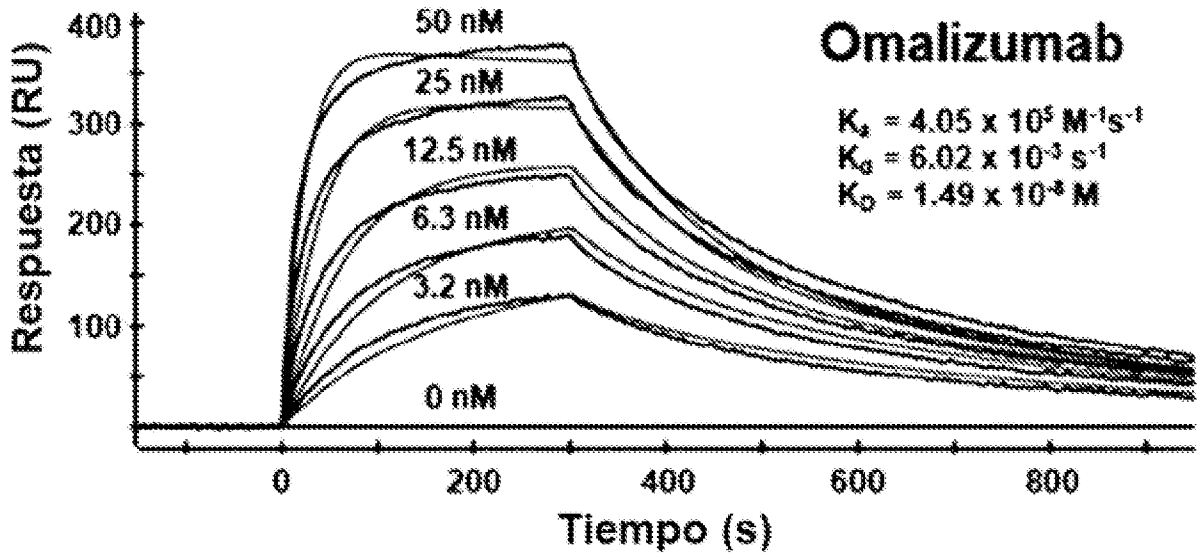
[FIG. 5]



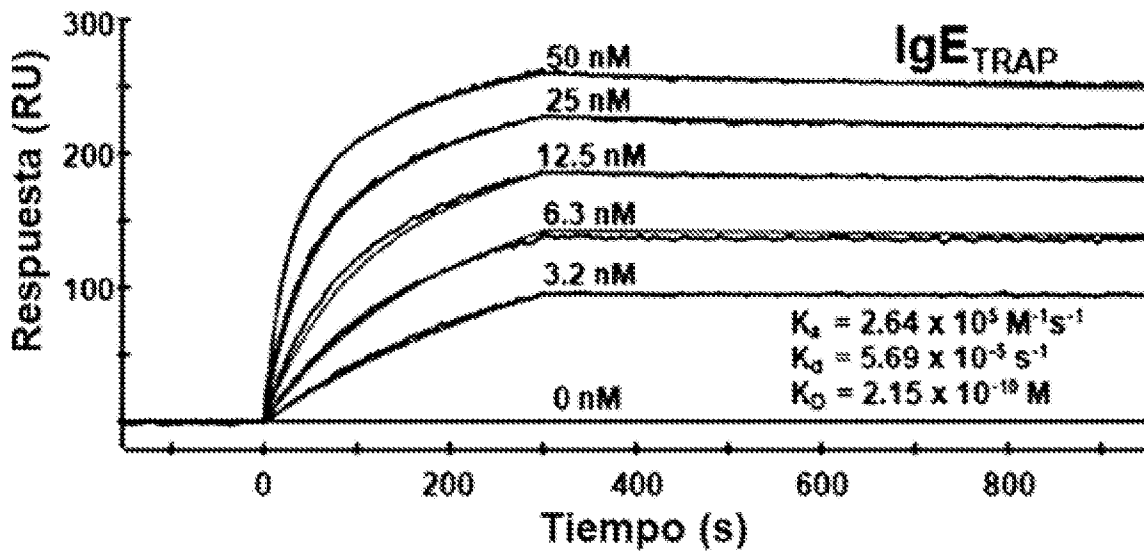
[FIG. 6]



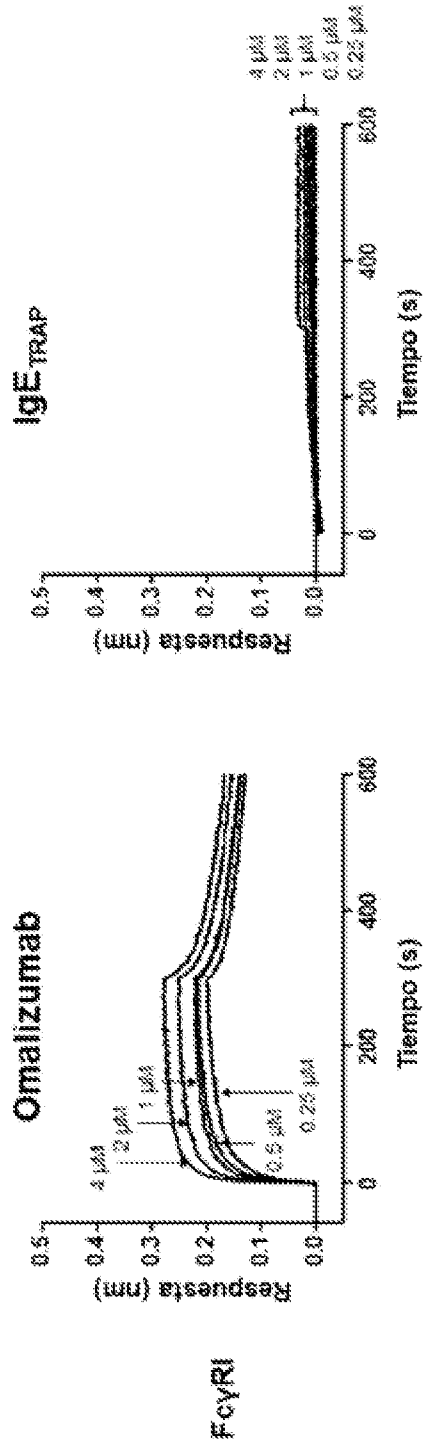
[FIG. 7]



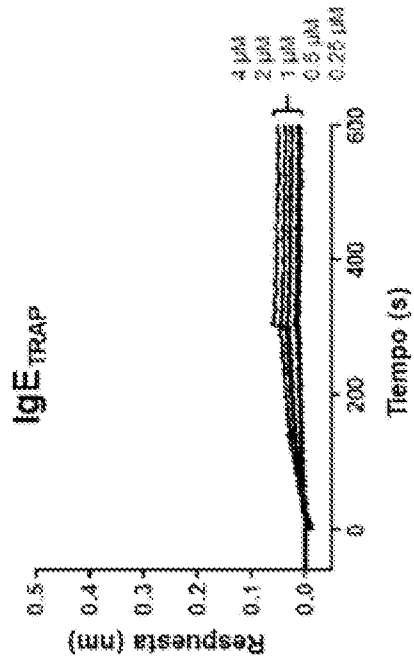
[FIG. 8]



[FIG. 9]

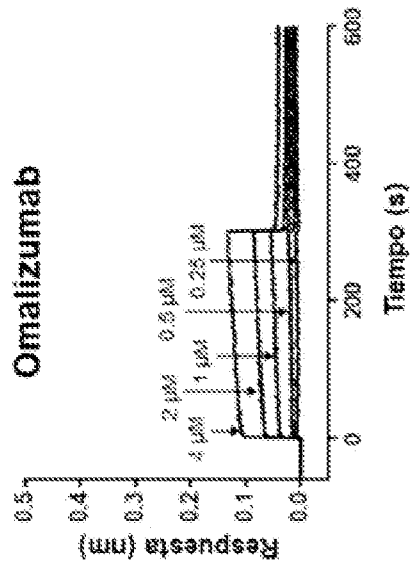
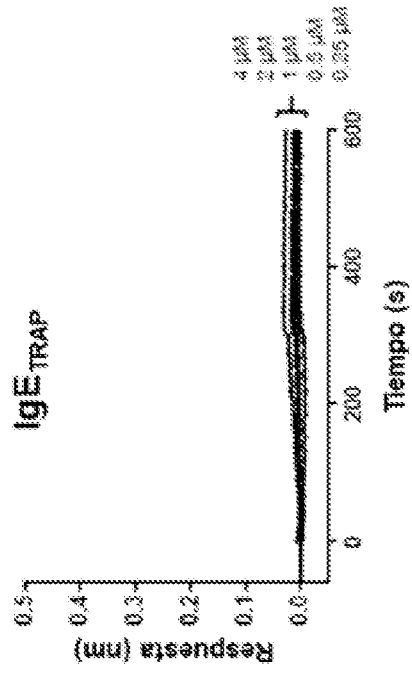


[FIG. 10]



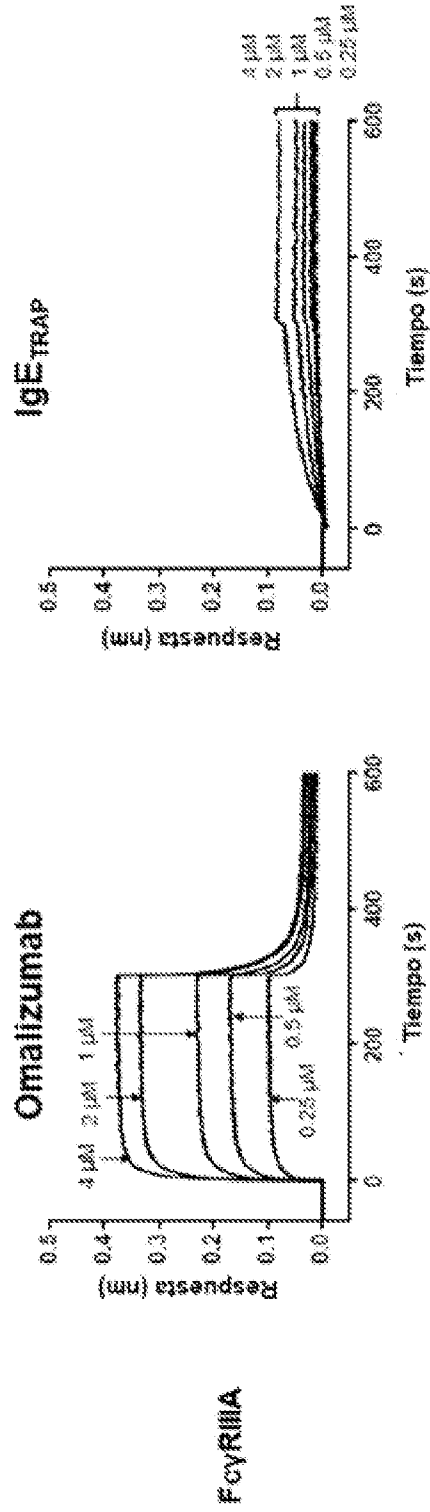
FcγRIIA

[FIG. 11]

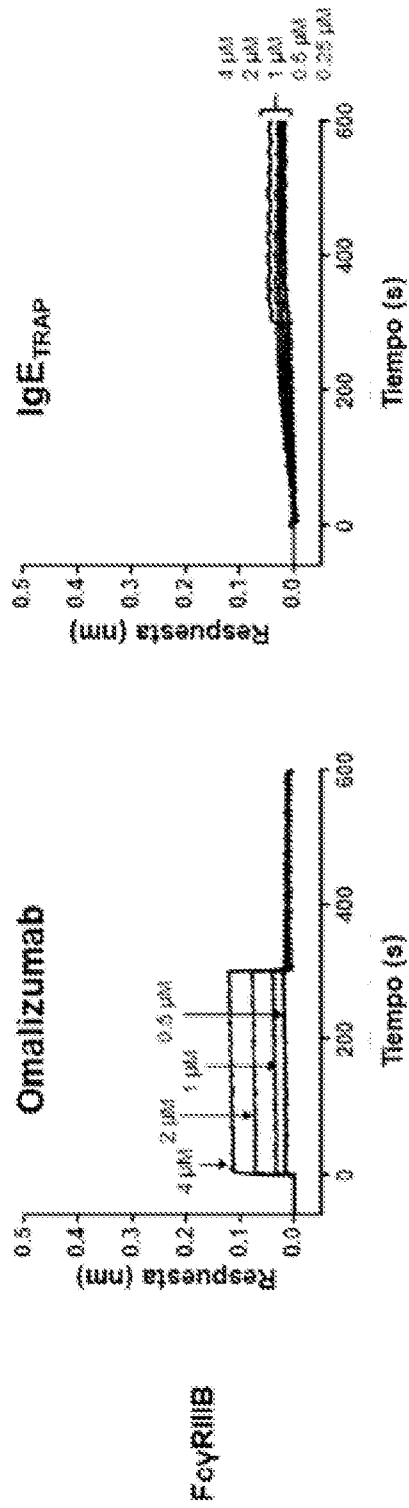


**FCγRIIB**

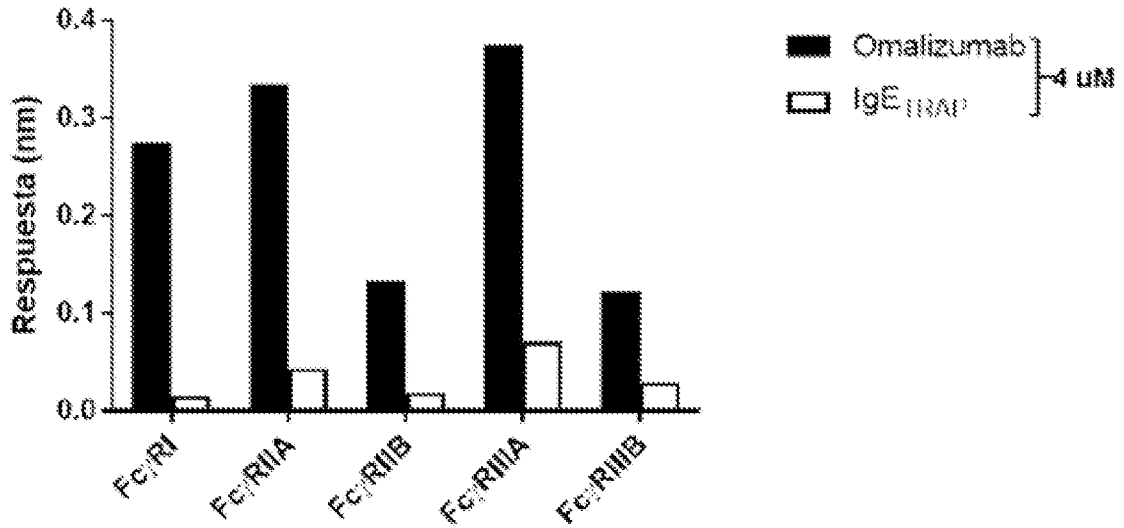
[FIG. 12]



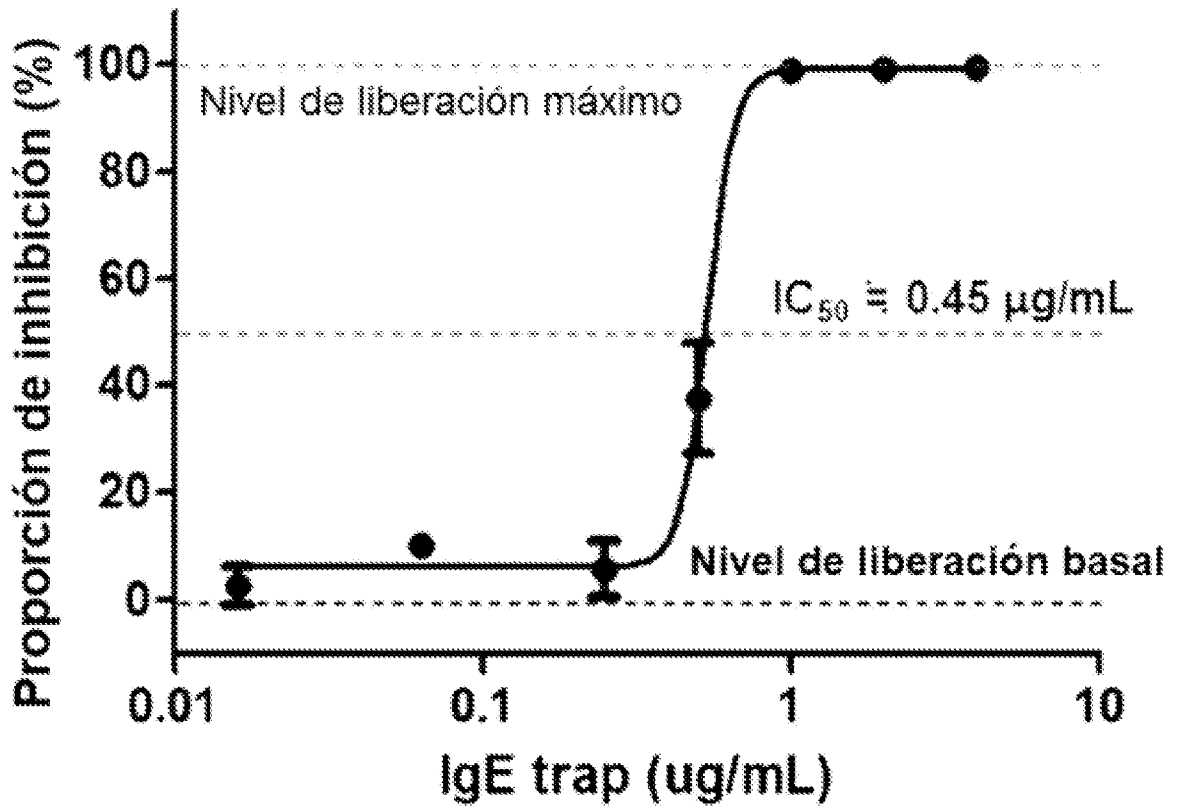
[FIG. 13]



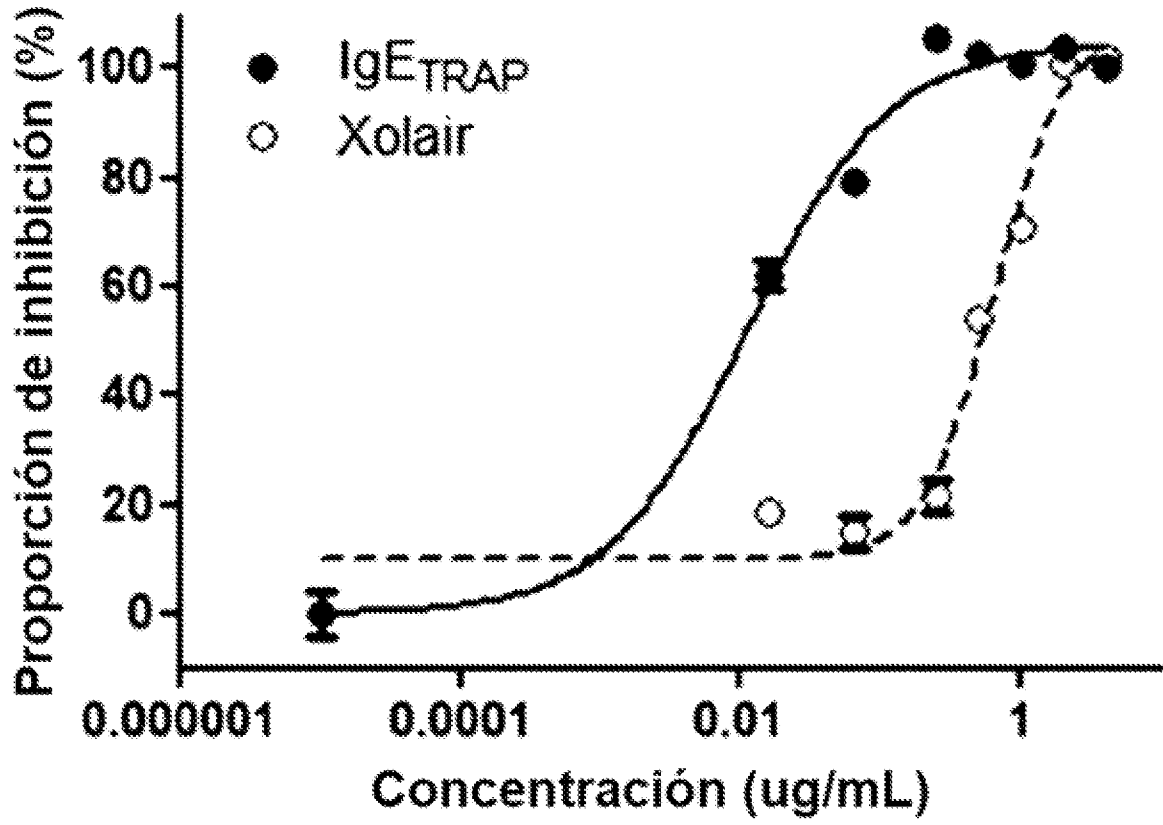
[FIG. 14]



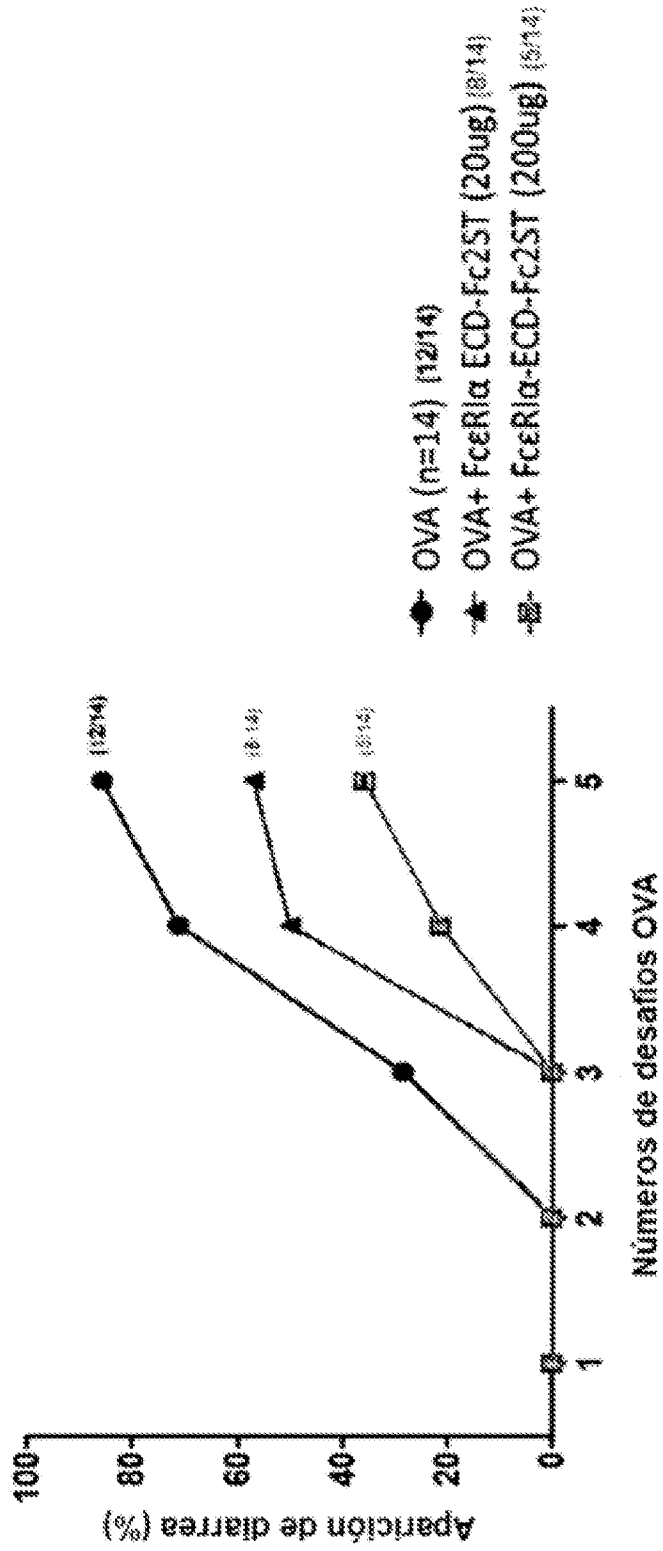
[FIG. 15A]



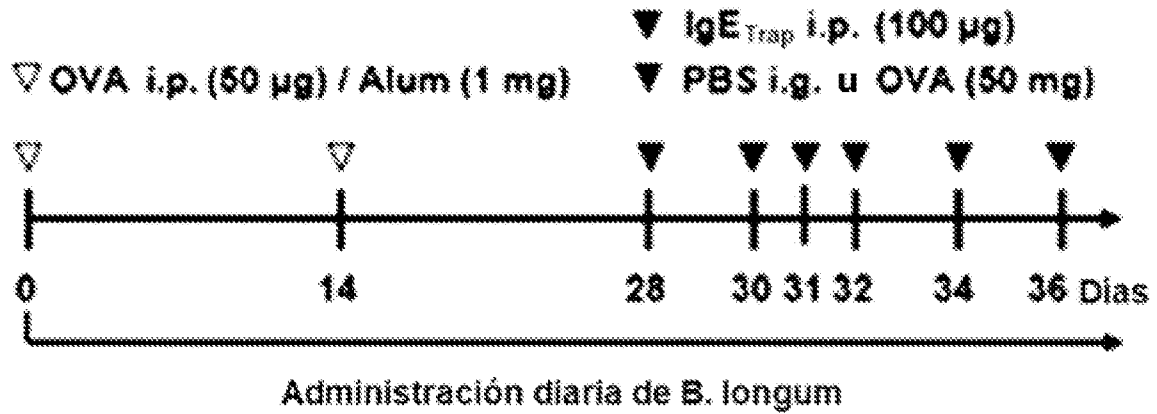
[FIG. 15B]



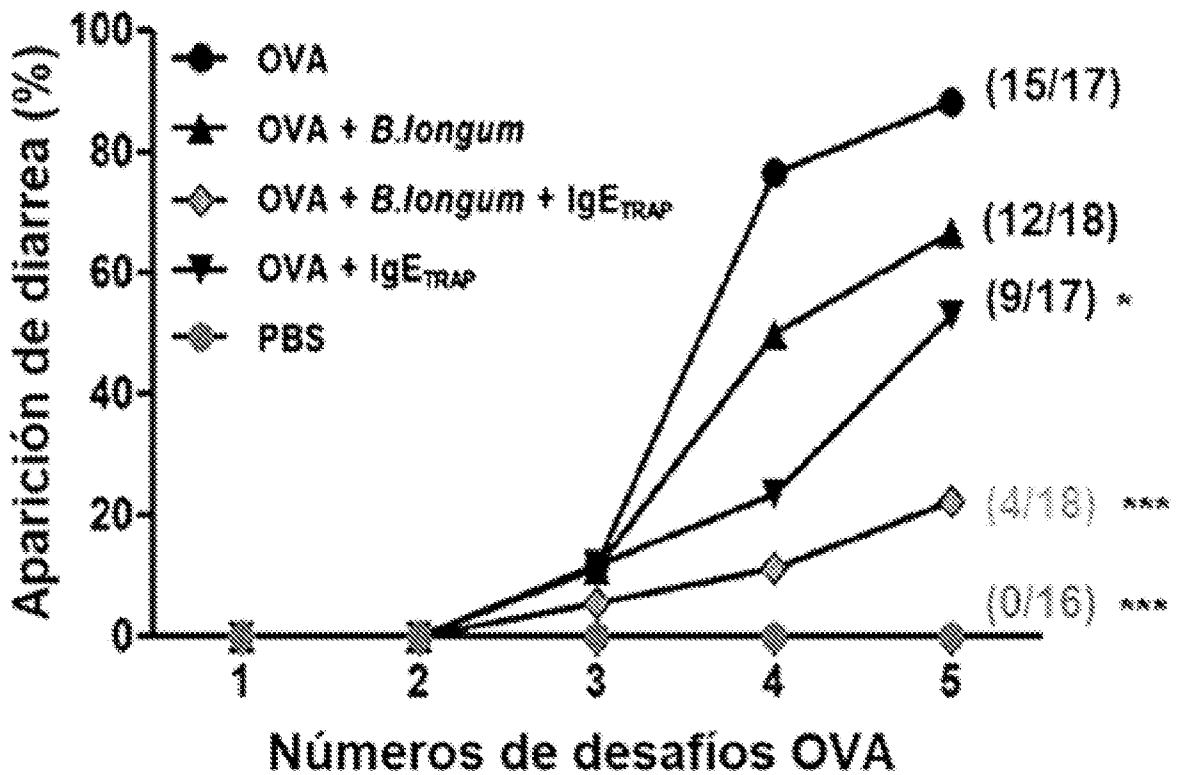
[FIG. 16]



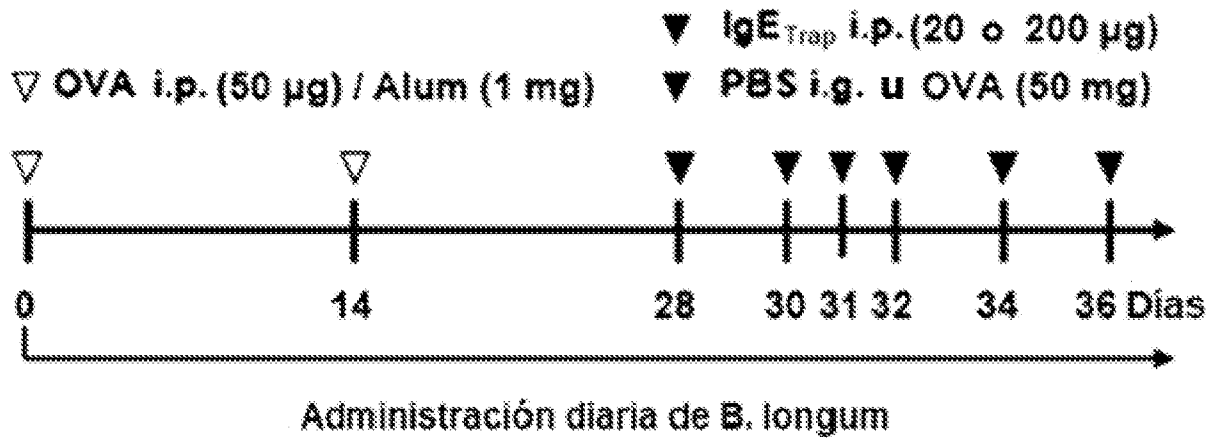
[FIG. 17]



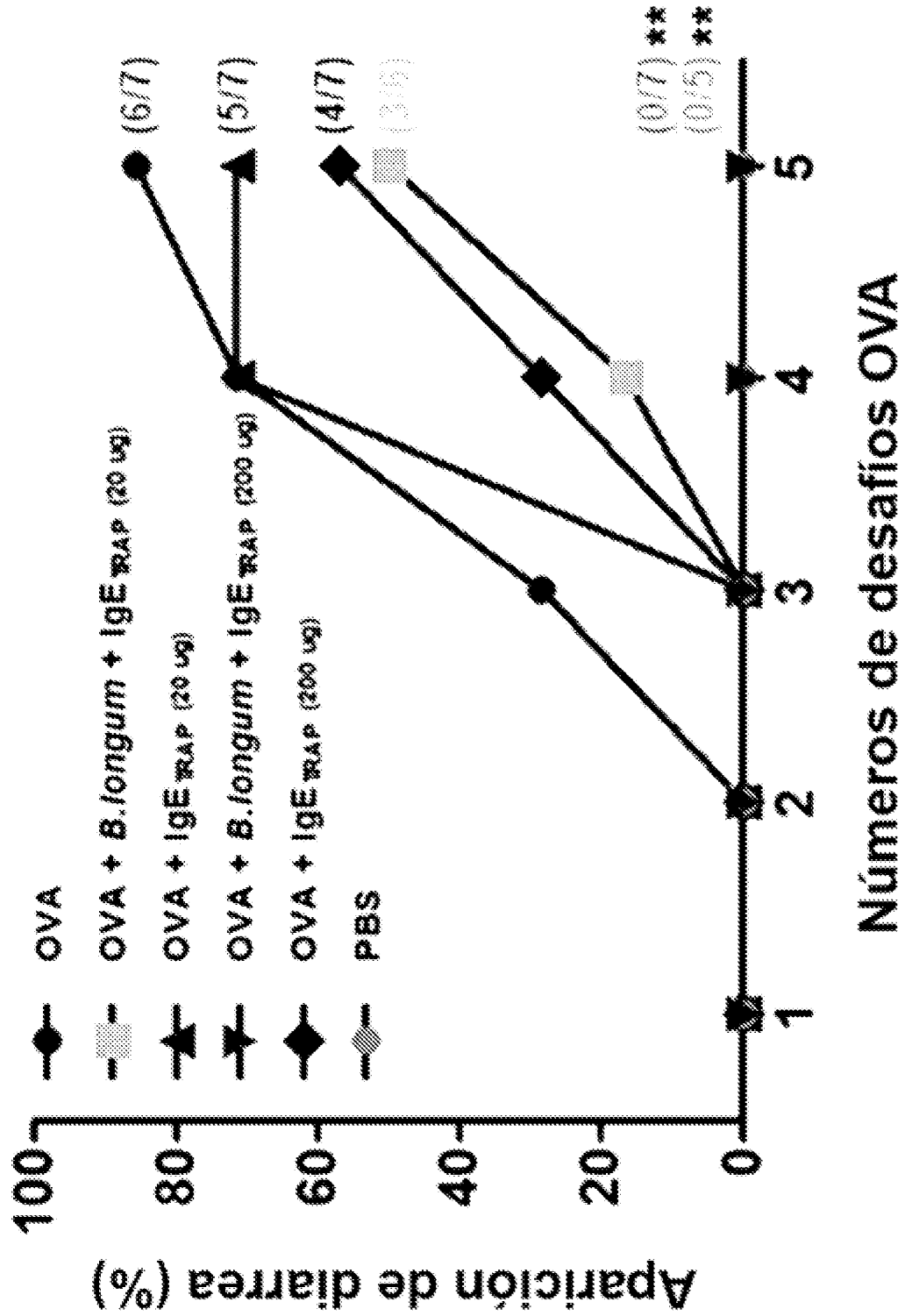
[FIG. 18]



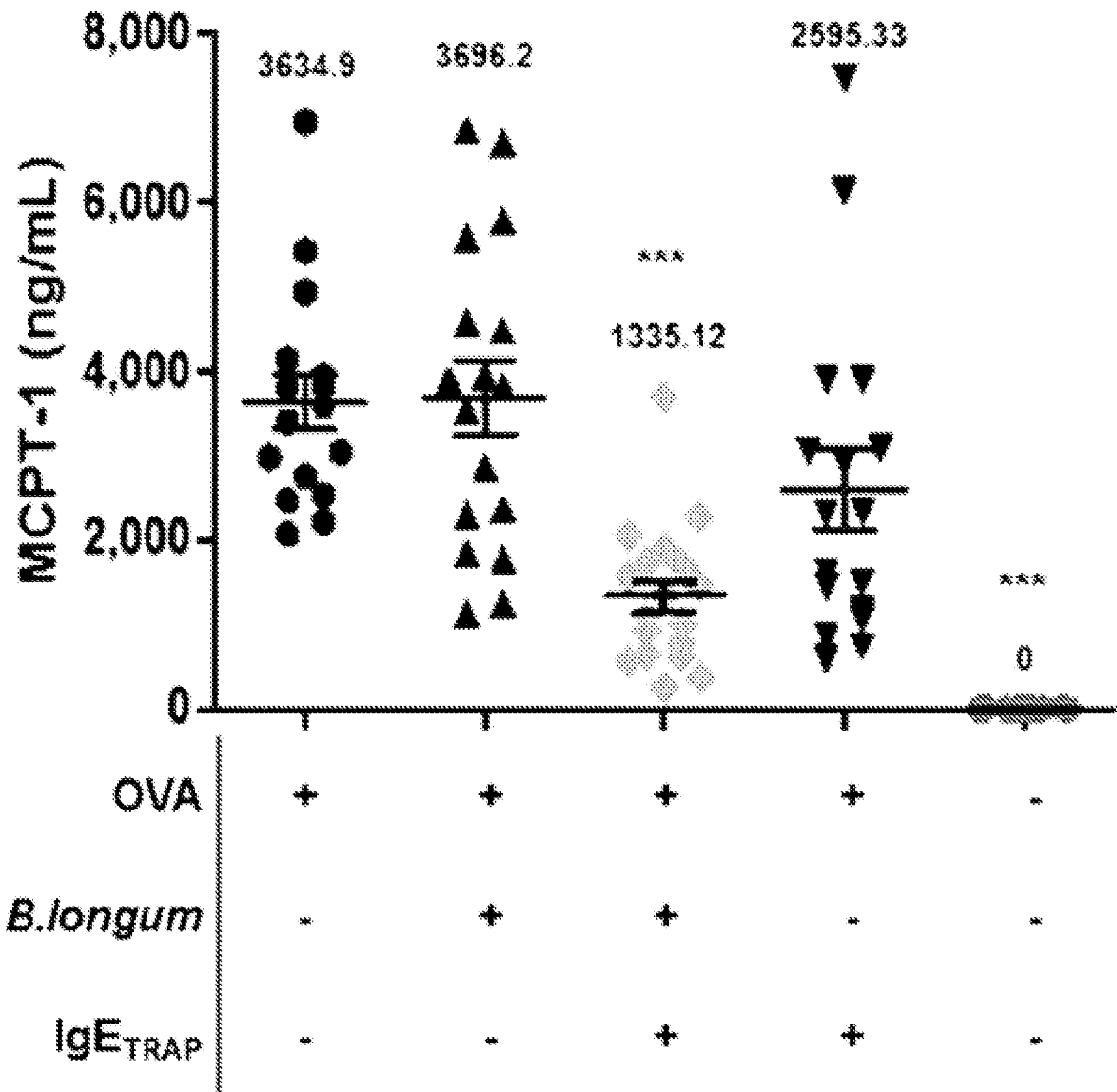
[FIG. 19A]



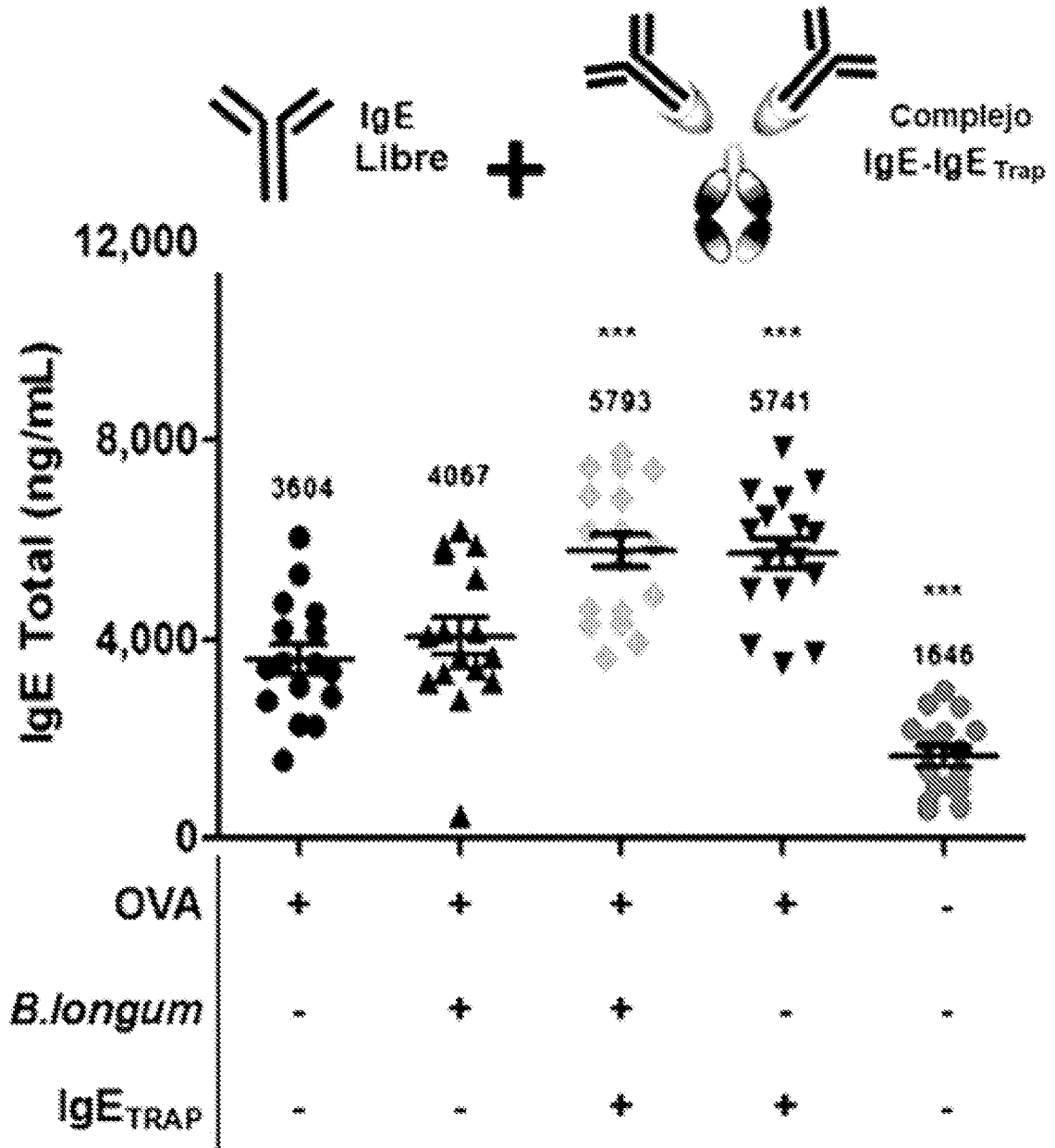
[FIG. 19B]



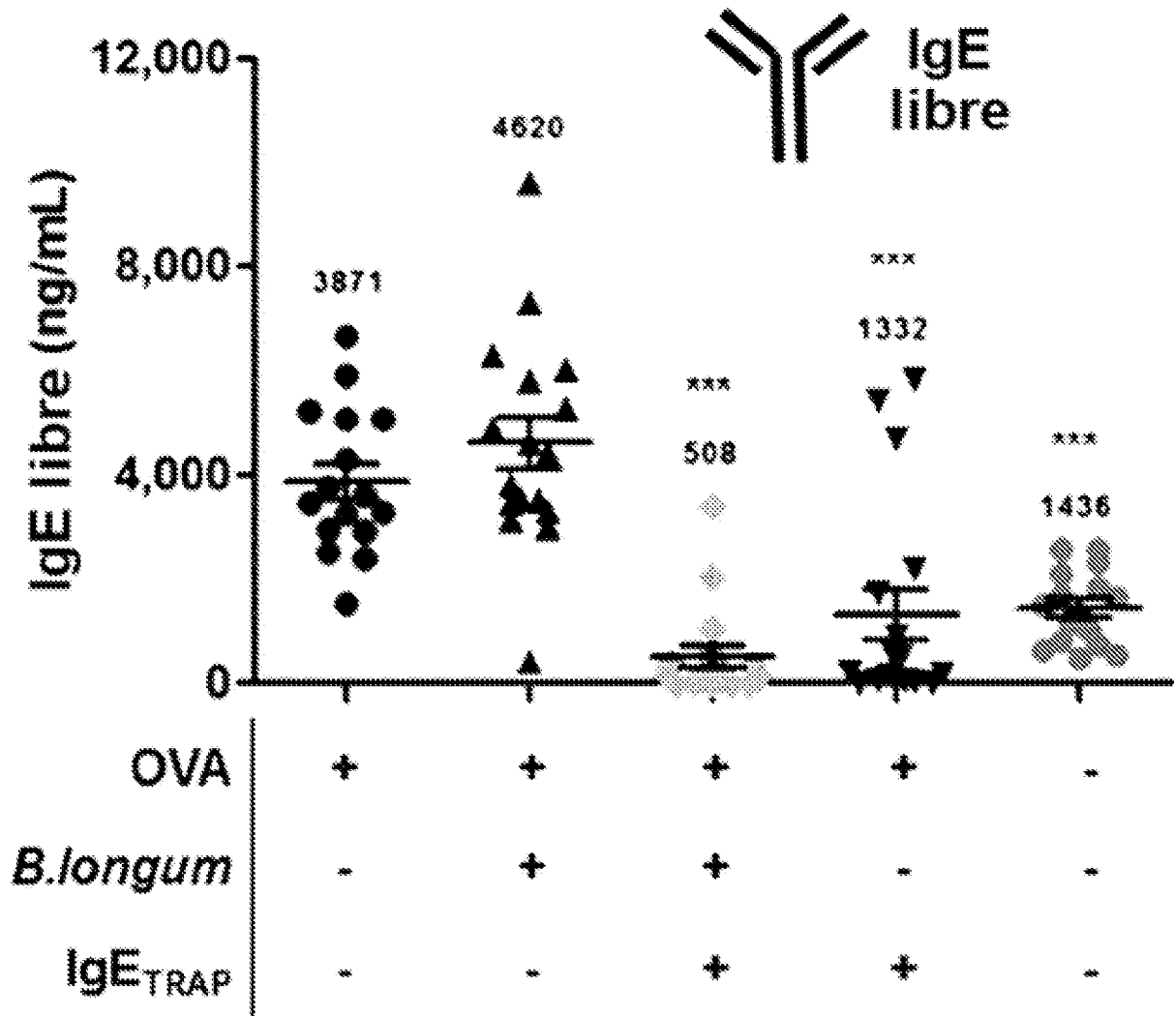
[FIG. 20]



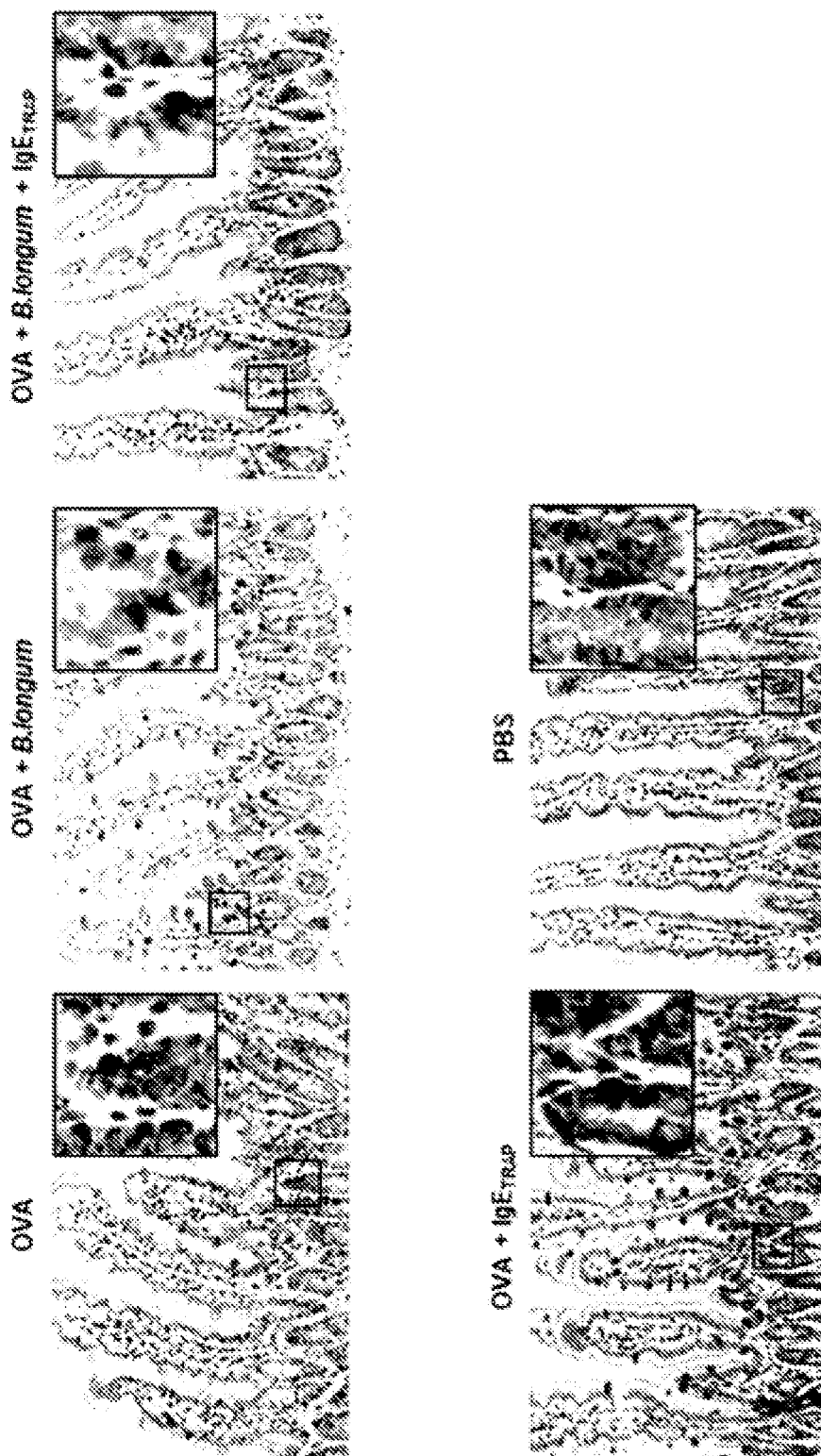
[FIG. 21]



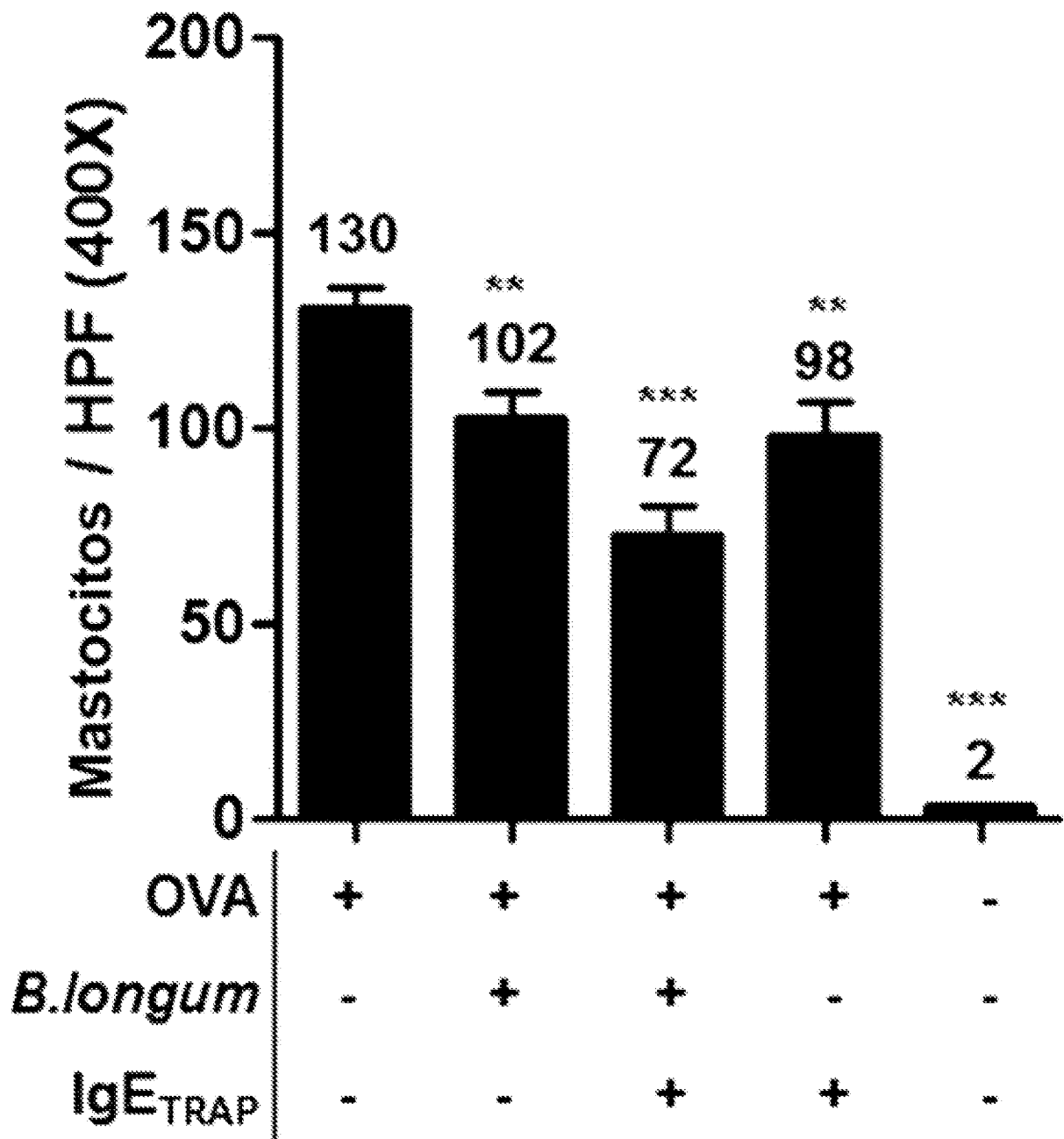
[FIG. 22]



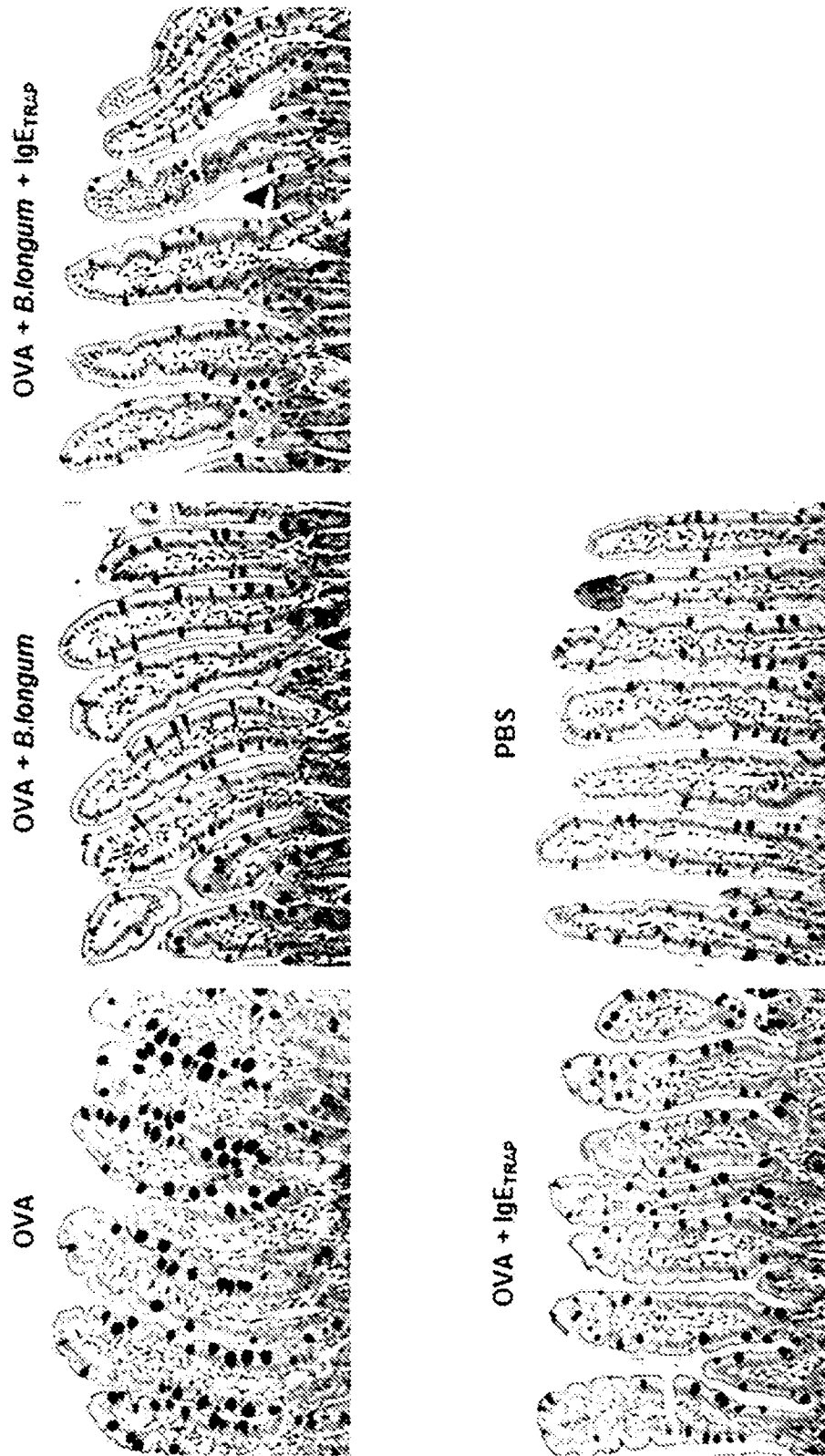
[FIG. 23]



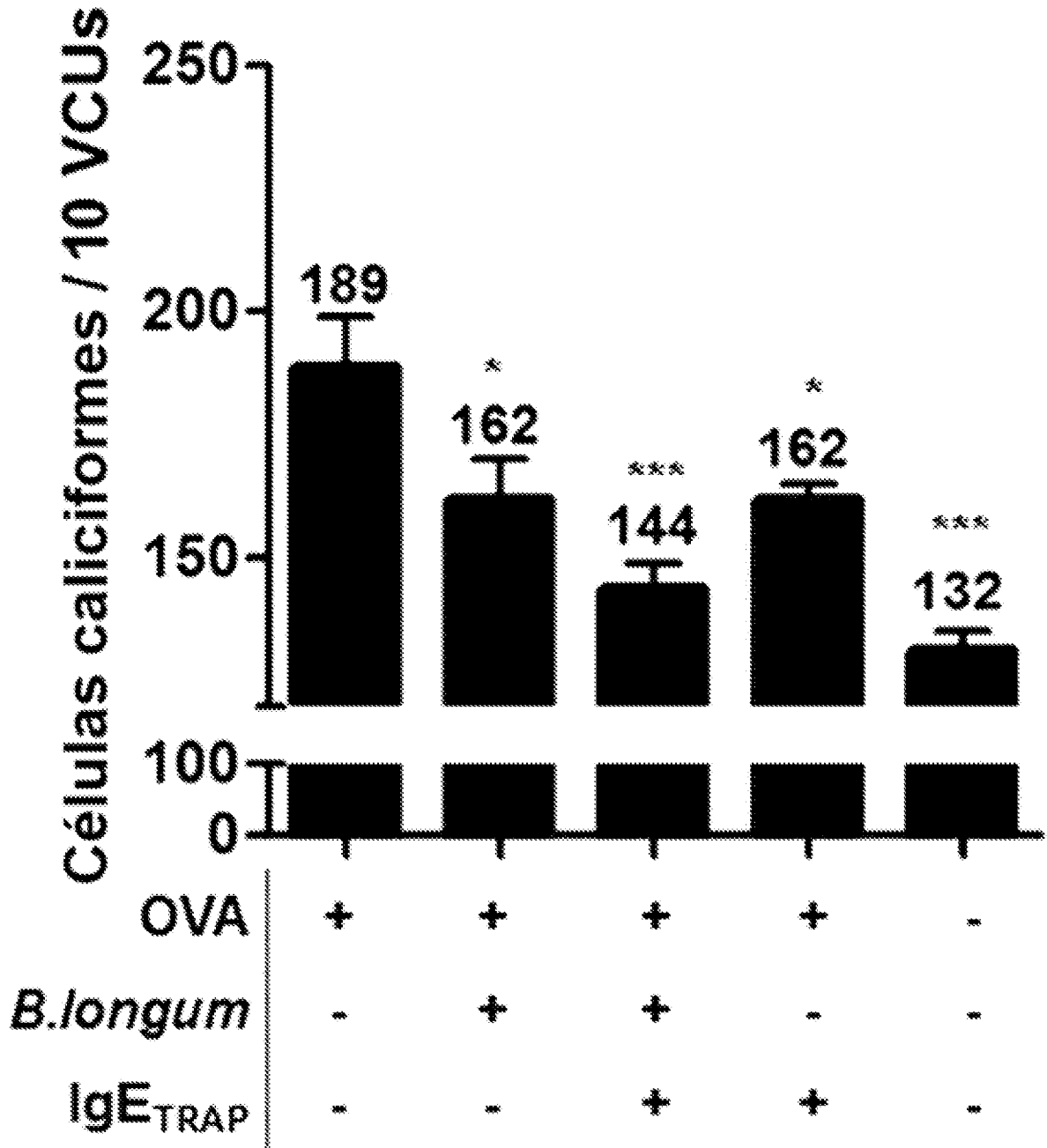
[FIG. 24]



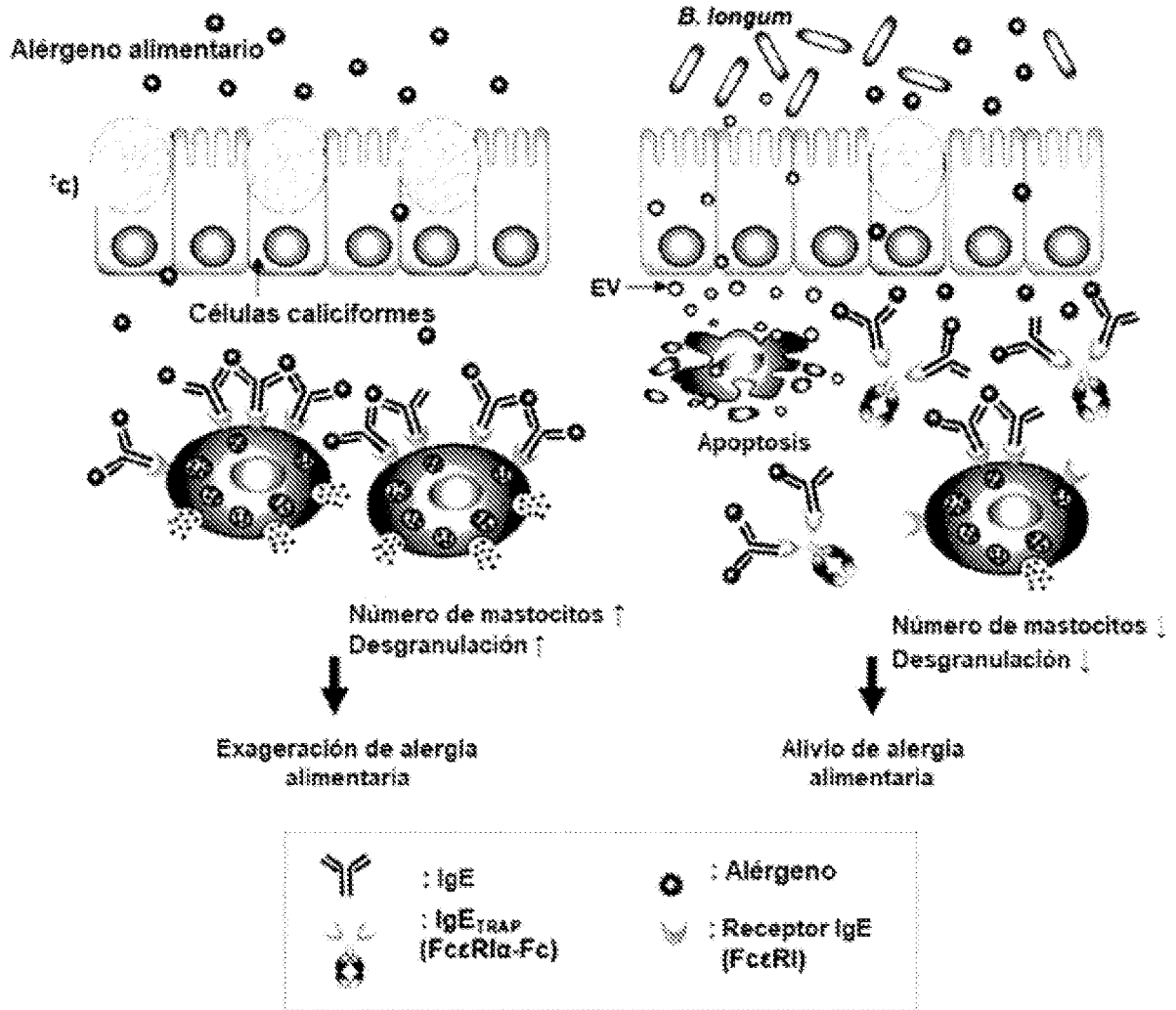
[FIG. 25]



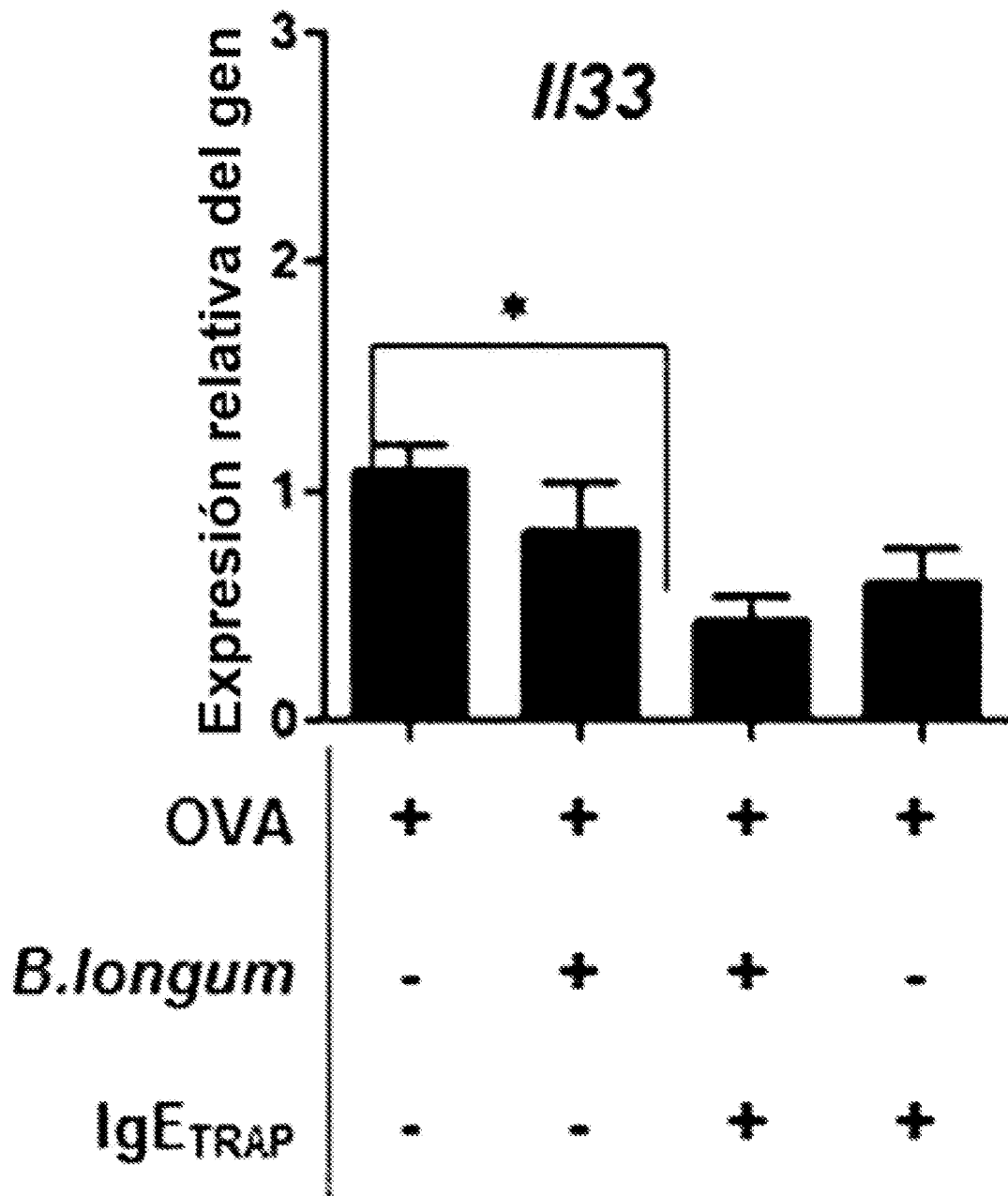
[FIG. 26]



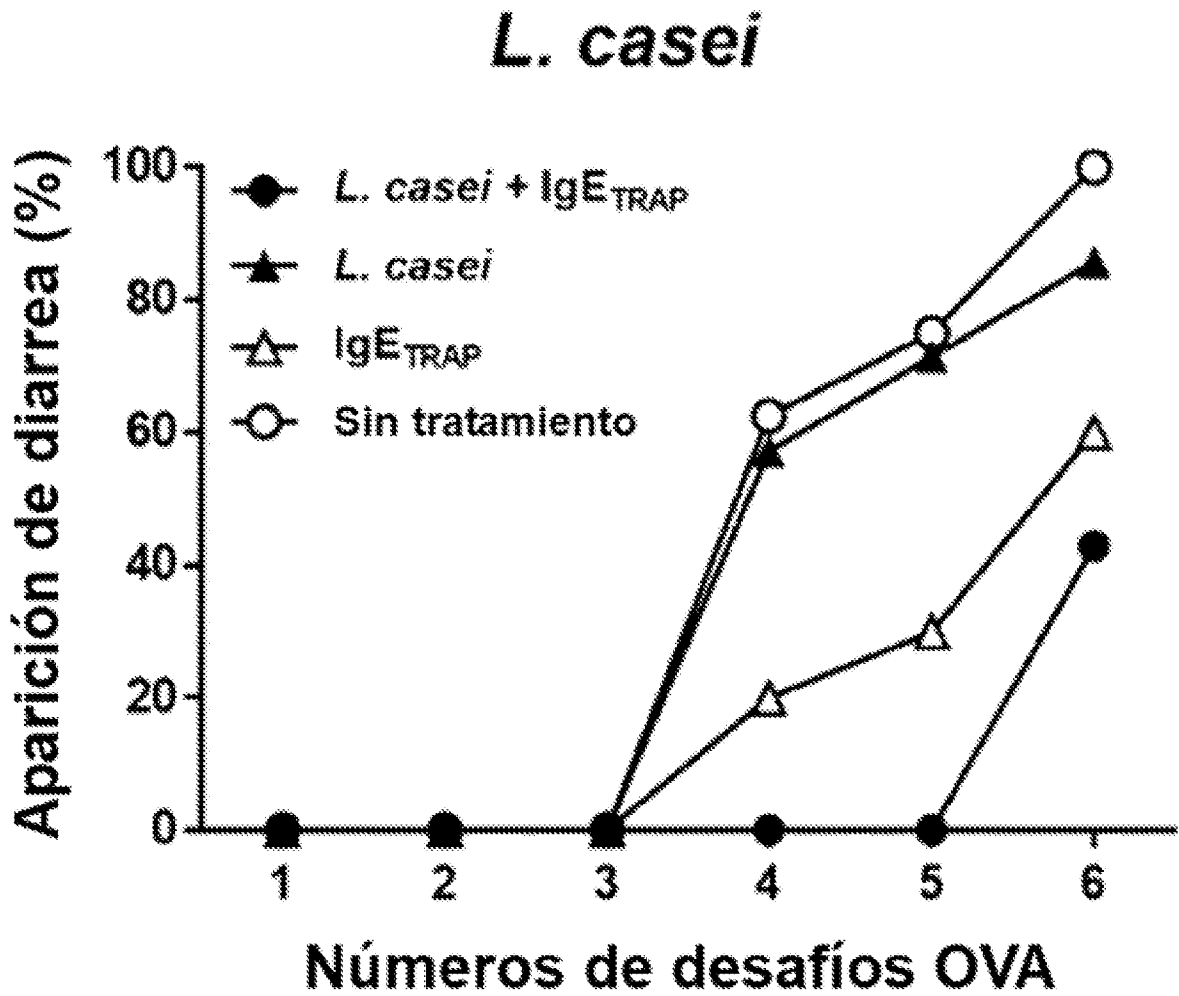
[FIG. 27]



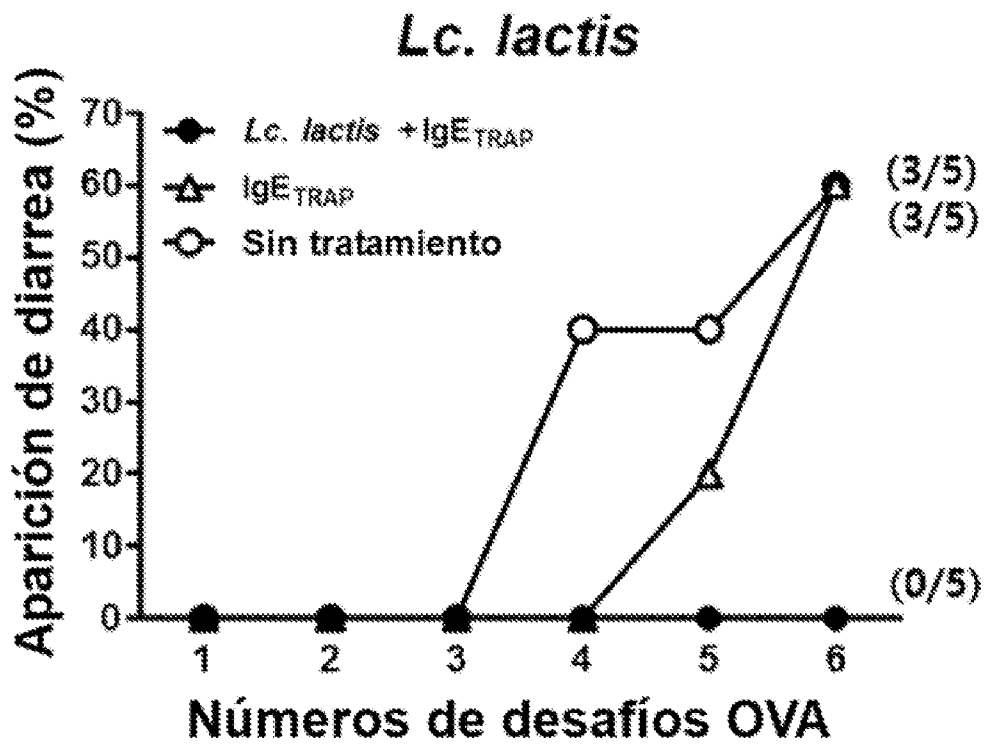
[FIG. 28]



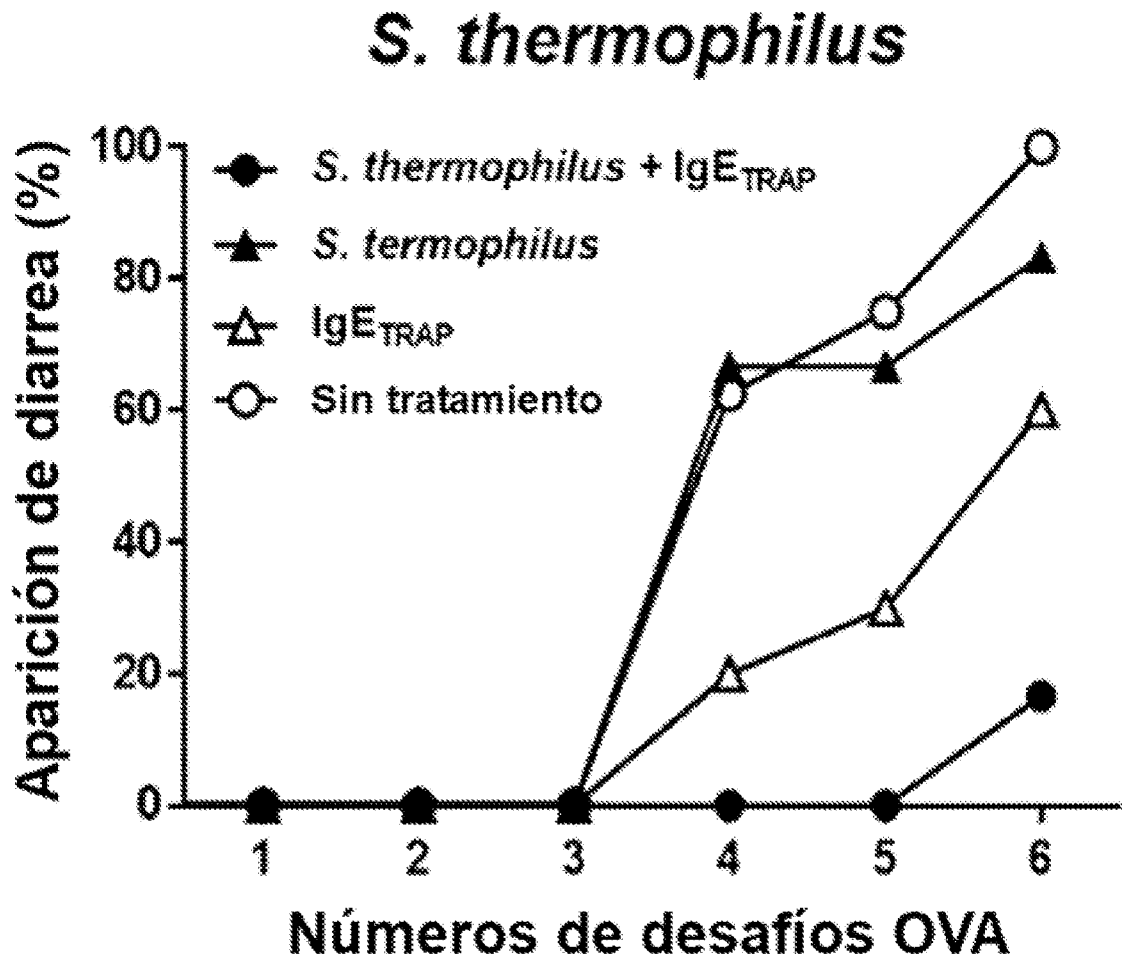
[FIG. 29]



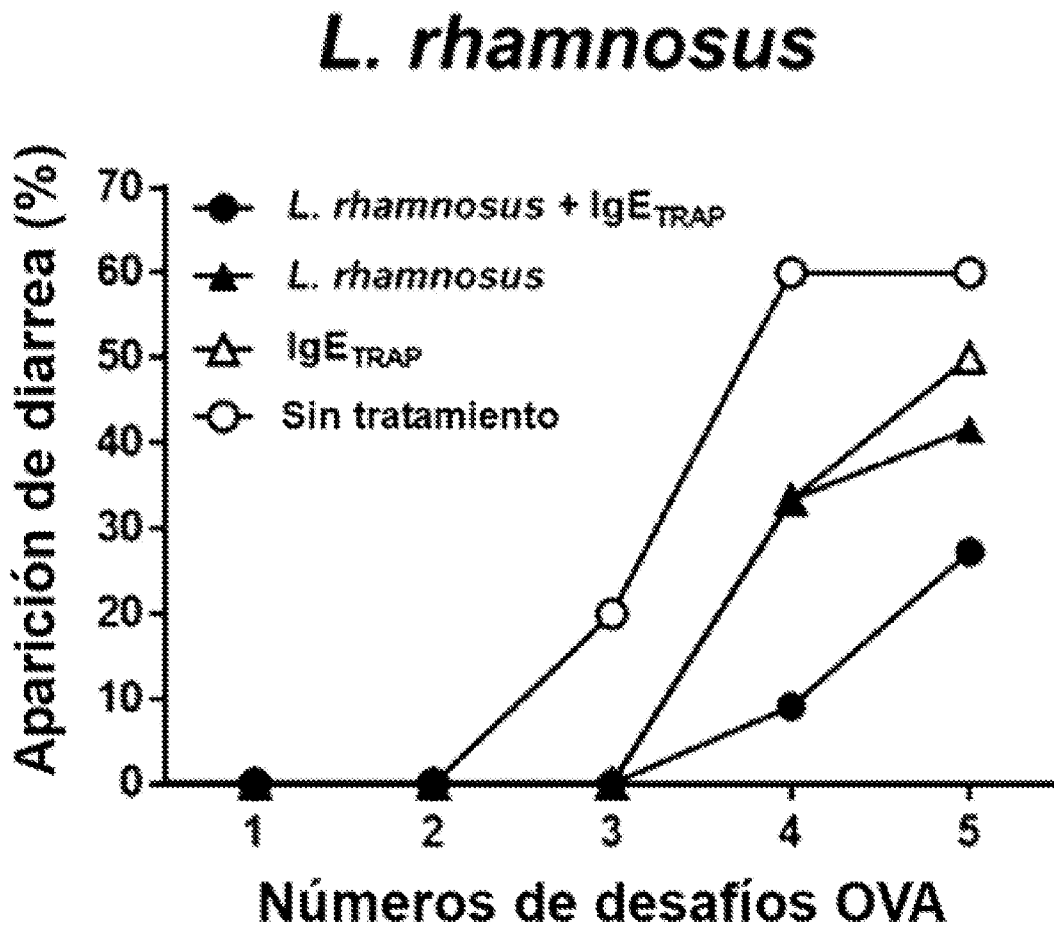
[FIG. 30]



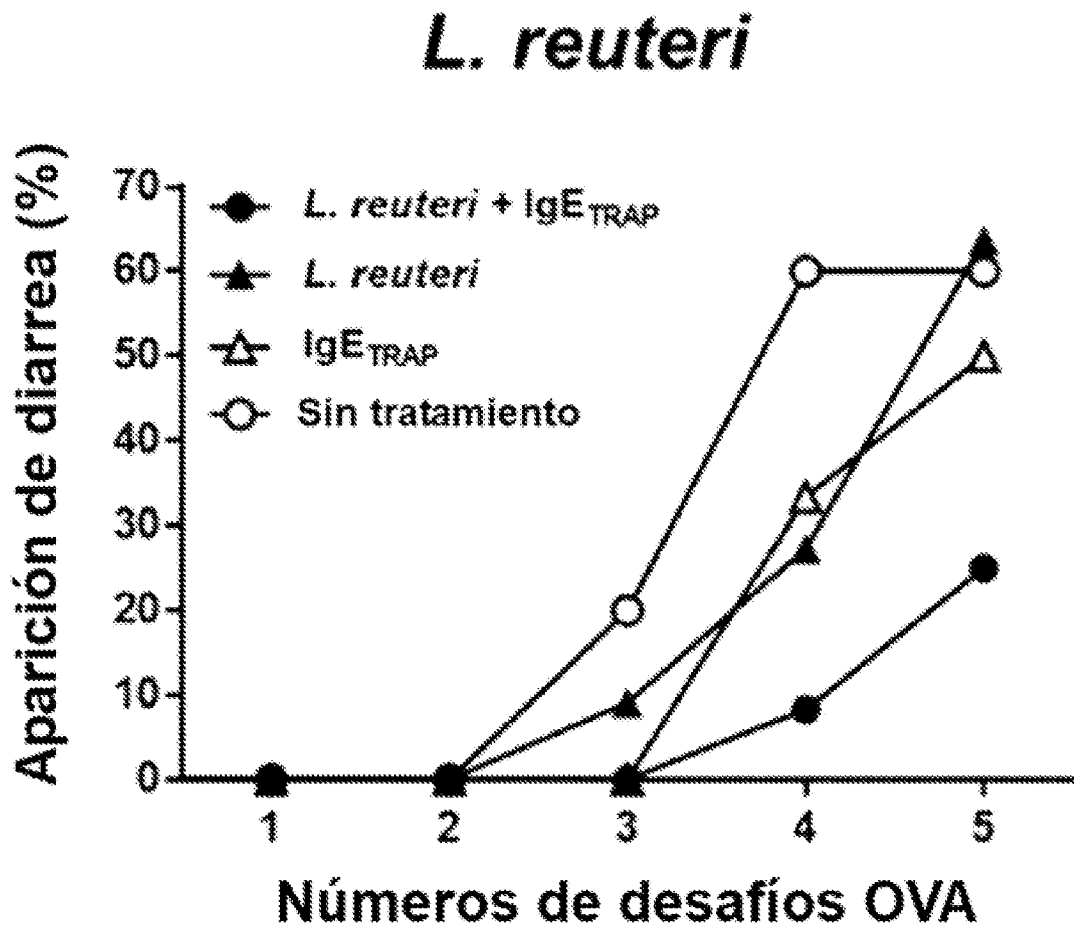
[FIG. 31]



[FIG. 32]

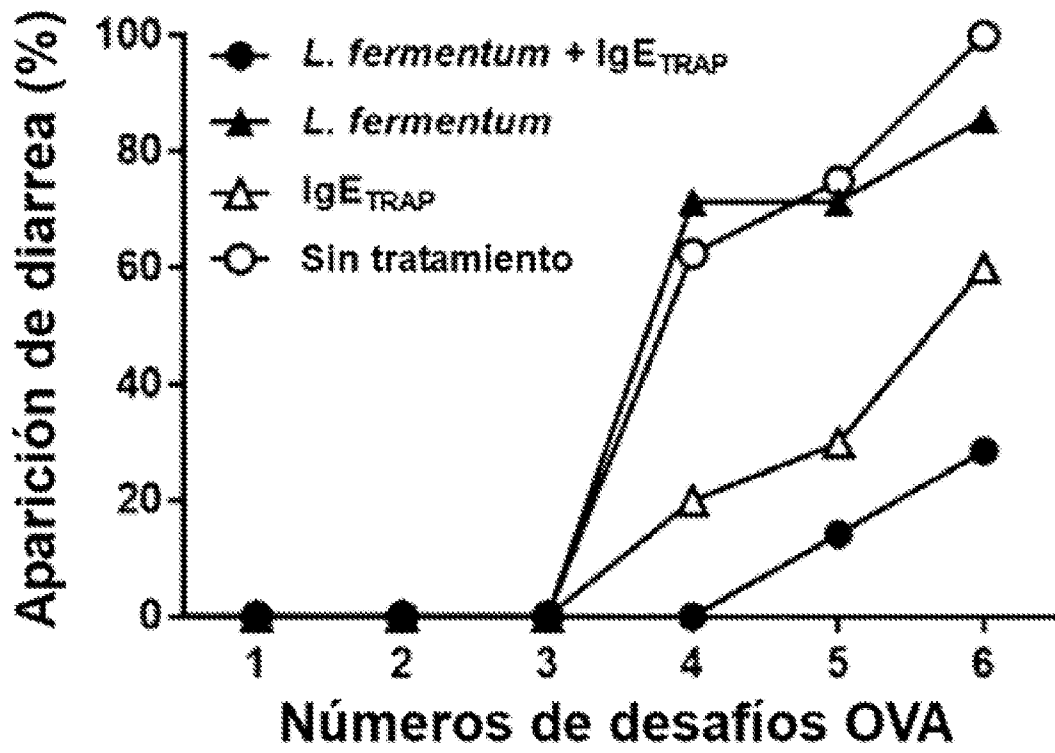


[FIG. 33]



[FIG. 34]

## *L. fermentum*



[FIG. 35]

