

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 410**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2014** E 14170362 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018** EP 2950095

54 Título: **Ensayo basado en células y métodos de cribado de moduladores de la señalización de p75NTR**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2019

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN (100.0%)
Helmholtzstrasse 10
01069 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

**BRENNER, SEBASTIAN;
RYSER, MARTIN;
RICHTER, CORNELIA y
THIEME, SEBASTIAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 699 410 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

Ensayo basado en células y métodos de cribado de moduladores de la señalización de p75^{NTR}

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a reacciones inmunitarias y sustancias de ensayo útiles para las mismas. Específicamente, la presente invención se refiere a la modulación del receptor del factor de crecimiento de nervios p75^{NTR} que expresan las células dendríticas plasmacitoides humanas y murinas. La invención proporciona ensayos para cribar un intervalo de agonistas y antagonistas útiles para la modulación de la función de citocinas, presentación de antígenos, activación y proliferación de células T. La presente invención proporciona adicionalmente, por lo tanto, ensayos de cribado de respuestas inmunitarias moduladas por agonistas y antagonistas de p75^{NTR}. Dichos agonistas y antagonistas son útiles en la fabricación de fármacos para controlar la función de citocinas, presentación de antígenos, activación y proliferación de células T, que es importante para el tratamiento de un intervalo de afecciones que incluyen el cáncer, reacciones inflamatorias, trastornos inmunológicos, trastorno del crecimiento y cualquiera de otras afecciones que implican la transducción de señal p75^{NTR}. La invención proporciona adicionalmente una combinación que comprende al menos una modulación de la señalización p75^{NTR} en las CDP seleccionado de entre un antagonista del p75^{NTR} o un agonista del p75^{NTR} y al menos un agonista del TLR9.

20 Antecedentes de la invención

Las funciones del sistema inmunitario protegen a los individuos de los agentes infecciosos, por ejemplo, bacterias, organismo multicelulares, y virus, así como de los cánceres. Este sistema incluye varios tipos de células linfoides y mieloides tales como las células T, células B, monocitos, macrófagos, células dendríticas (CD), eosinófilos y neutrófilos. Estas células linfoides y mieloides a menudo producen proteínas de señalización conocidas como citocinas. La respuesta inmunitaria incluye la inflamación, es decir, la acumulación de células inmunitarias sistémicamente o en una localización particular del cuerpo y puede dar lugar a una enfermedad autoinmunitaria o enfermedad del injerto contra el huésped. En respuesta a un agente infeccioso o sustancia ajena, las células inmunitarias secretan citocinas que, a su vez, modulan la proliferación, desarrollo, diferenciación o migración de células inmunitarias. Las citocinas se han implicado en la patología de varios trastornos y afecciones.

En más detalle, el sistema inmunitario humano se ha desarrollado para darnos una protección contra los microbios mediante la coordinación de los mecanismos inmunitarios innatos (no específicos) y adaptativos/adquiridos (combinación de respuestas inmunitarias mediadas por células y humorales). Las células de inmunidad innata incluyen las células epiteliales, células NK (citolíticas naturales) y CDP (células dendríticas plasmacitoides). Estas células funcionan como la primera línea de defensa del cuerpo contra cualquier microbio que ataque secretando citocinas antimicrobianas, por ejemplo, en un encuentro vírico las CDP secretan interferones tipo I (IFN), una familia de citocinas antivíricas con potente actividad antivírica. La inmunidad adaptativa, por otra parte, incluye las respuestas inmunitarias basadas en las células T auxiliares (Th1 y Th2) y células T citotóxicas (inmunidad mediada por células) y células B que se diferencian en células plasmáticas B que producen anticuerpos específicos del antígeno (inmunidad humoral). Las CDP, además de su papel vital en la inmunidad innata, tiene la capacidad de desencadenar respuestas de células T y regulan el crecimiento y diferenciación de las células B en células plasmáticas que secretan anticuerpos. Las CDP contribuyen esencialmente a la regulación y conexión de las respuestas inmunitarias adaptativas e innatas inducidas por el antígeno.

Las CDP expresan los receptores tipo toll (TLR) endosómicos y son de hecho las únicas células humanas que expresan receptores de tipo toll 7 (TLR7) y 9 (TLR9) que son capaces de unirse al ARN vírico de cadena sencilla y ADN bacteriano o vírico, respectivamente. Al activarse el TLR7 y TLR9, se activa una cascada de señalización que implica MyD88, TRAF6, IRF3 y IRF7, que en último término da lugar a la producción de niveles muy altos de interferón alfa. El interferón alfa induce reacciones inmunitarias Th1 y tiene múltiples funciones en el cuerpo humano en la defensa vírica, en la eliminación de células tumorales, pero también en la inducción de autoinmunidad. Durante mucho tiempo la producción de interferón al activarse el receptor tipo toll asociada a la inducción de la reacción inmunitaria de Th1 parecía ser la única función que se podía atribuir a las CDP.

TRAF3 y TRAF6 son miembros proteicos humanos de la familia de proteínas del factor asociado al receptor TNF (TRAF). Los TRAF proteicos se asocian con, y median la transducción de la señal de los miembros de la superfamilia del receptor TNF. Estas proteínas median la señalización no solo de los miembros de la superfamilia del receptor TNF, sino también de la familia de Toll/IL-1.

La pérdida de la expresión del gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloides (MyD88) se asocia con la disminución de la resistencia a infecciones bacterianas. Además, se han identificado formas mutadas de MyD88 en distintos linfomas humanos (Hawn et al., J Infect Dis. (2006) 193 (12): 1693-1702).

Los factores reguladores de interferón (IRF) 3 y 7 son miembros de la familia del factor regulador de interferón de factores de transcripción. Se ha demostrado que el IRF3 y 7 tiene un papel en la activación transcripcional de genes celulares inducibles por virus, que incluyen genes de interferón tipo I proinflamatorios. En particular, el IRF7 regula

muchos genes de interferón-alfa. La expresión constitutiva de IRF7 está muy restringida al tejido linfoide, particularmente las CDP. La expresión de IRF7, sin embargo, se puede inducir en muchos tejidos.

5 Las neurotrofinas son la familia de proteínas que se considera que tienen un papel esencial en el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados. El factor de crecimiento de nervios (NGF) es el miembro mejor caracterizado de la familia de las neurotrofinas y fue el primero que se aisló. Otros miembros de la cada vez mayor familia de neurotrofinas incluyen: factor nervioso derivado del cerebro (BDNF), Neurotrofina-3 (NT-3) y Neurotrofina-4 y 5 (NT-4 y NT-5). Las neurotrofinas median sus efectos uniéndose a dos clases de receptores con diferentes afinidades: i) receptor de crecimiento de nervios de alta afinidad que incluye: el Trk A, Trk B y Trk C (cinasa del receptor de tropomiosina A, B y C), y ii) receptor de crecimiento de nervios de baja afinidad (LNGFR), miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, que también se conoce como p75NTR o CD271 (Lykissas et al, Curr Neurovasc Res. 2007 May;4(2): 143-51).

15 En años recientes se ha demostrado que las CDP también tienen un papel pivotante en la regulación de respuestas inmunitarias frente a antígenos exógenos y autoantígenos. Se pudo demostrar que el agotamiento de CDP en los ratones agrava el Asma alérgica, que es una respuesta inmunitaria Th2, pero también empeora la reacción autoinmunitaria en encefalomiелitis autoinmune experimental, un modelo de ratón de esclerosis múltiple, que se basa en una respuesta inmunitaria Th1. A partir de estos resultados se podría deducir que las CDP tienen una función reguladora principal para inducir tolerancia, pero también pueden estar implicadas en el escape de células tumorales de la inmunidad del huésped.

25 La inducción de la reacción inmunitaria y la inhibición de la tolerancia son determinantes principales del éxito de las estrategias de vacunación. Las vacunas clásicas se basan en la inducción de reacciones inmunitarias Th2 para inducir una inmunidad humoral contra los antígenos vacunales. Como las vacunas atenuadas no inducen una reacción inmunitaria fuerte, se utilizan adyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria. Los adyuvantes que induce Th2 más comunes son las sales de aluminio. Con el fin de destruir organismos intracelulares o para eliminar células tumorales se necesita inducir respuestas inmunitarias Th1 citotóxicas. La mayoría de los adyuvantes que inducen Th1 actúan mediante la activación de los receptores tipo toll. Un repaso de los adyuvantes actuales o los nuevos adyuvantes que están evaluándose en ensayos clínicos se muestran en la Tabla 1 a continuación:

30

Tabla 1

Nombre del adyuvante	Clase	Mecanismo o receptor	Tipo de respuesta inmunitaria	Fase clínica o nombre del producto con licencia
Análogos de ARNds (por ejemplo, poli(I:C))	IM	TLR3	Ab, Th1, CD8+ Células T	Fase 1
Análogos de Lípido A (por ejemplo, MPL, RC529, GLA, E6020)	IM	TLR4	Ab, Th1	Cervarix, Supravax, Pollinex Quattro, Meiacine
Flagelina	IM	TLR5	Ab, Th1, Th2	Fase 1
Imidazoquinolinas (por ejemplo, Imiquimod, R848)	IM	TLR7 y TLR8	Ab, Th1	Aldara
CpG ODN	IM	TLR9	Ab, Th1, CD8+ Células T	Fase 3
Saponinas (por ejemplo, QS21)	IM	Desconocido	Ab, Th1, Th2, CD8+ Células T	Fase 3
Ligandos de lectinas tipo C (por ejemplo, TDB)	IM	Mincle, Nalp3	Ab, Th1, Th17	Fase 1
Ligandos CD Id (por ejemplo, a-galactosilceramida)	IM	CDId	Ab, Th1, Th2, CD8+ células NKT	Fase 1
Sales de aluminio (por ejemplo, oxihidróxido de aluminio, fosfato de aluminio)	PF	Nalp3, IT AM, suministro de Ag	Ab, Th2	Muchos productos con licencia
Emulsiones (por ejemplo, MF59, AS03, AF03, SE)	PF	Reclutamiento de células inmunitarias, ASC, captación de Ag	Ab, Th1, Th2	Fluad, Pandemrix
Virosomas	PF	Suministro de Ag	Ab, Th1, Th2	Epaxal, Inflexal V

AS01 (MPL.QS21, liposomas)	c	TLR4	Ab, Th1, CD8+ Células T	Fase 3
AS02 (MPL.QS21, emulsión)	C	TLR4	Ab, Th1	Fase 3
AS04 (MPL, sal de aluminio)	C	TLR4	Ab, Th1	Cervarix
AS 15 (MPL, QS21, CpG, liposomas)	C	TLR4 y TLR9	Ab, Th1, CD8+ Células T	Fase 3
GLA-SE (GLA, emulsión)	C	TLR4	Ab, Th1	Fase 1
IC31 (CpG, péptido catiónico)	C	TLR9	Ab, Th1, Th2, CD8+ Células T	Fase 1
CAFOI (TDB, liposomas catiónicos)	C	Mincle, suministro de Ag	Ab, Th1, CD8+ Células T	Fase 1
ISCOMs (saponina, fosfolípido)	C	Desconocido	Ab, Th1, Th2, CD8+ Células T	Fase 2

Ab, anticuerpo; Ag, antígeno; ASC, dominio de reclutamiento que contiene proteína tipo manchada asociada a apoptosis; C, combinación de molécula inmunomoduladora y formulación en partículas; ARNds, ARN de cadena doble; IM, molécula inmunomoduladora; ITAM, motivo de activación basado en el inmunorreceptor de tirosina; PF, formulación en partículas; TDB, dibenehato de trealosa. Algunas formulaciones en partículas (tal como las sales de aluminio y emulsiones) también generan una actividad inmunomoduladora.

Sumario de la invención

5 La invención se basa en el hallazgo inesperado de que las células dendríticas plasmacitoides expresan el receptor del factor de crecimiento de nervios p75^{NTR}. Se pudo establecer posteriormente que el p75^{NTR} es un regulador importante de las respuestas inmunitarias dirigidas por las CDP. La activación del p75^{NTR} sobre las CDP induce fuertemente respuestas inmunitarias Th2 e inhibe las respuestas Th1.

10 La invención proporciona una combinación que comprende al menos un modulador de la señalización de p75^{NTR} en las CDP seleccionado de entre un antagonista de p75^{NTR} y un agonista de p75^{NTR} y al menos un agonista del TLR9, en el que el agonista o antagonista modula la respuesta inmunitaria y/o la proliferación celular.

15 En otro aspecto, la invención proporciona dicha combinación para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad o afección patológica que implica la señalización de p75^{NTR}, tal como un trastorno inflamatorio, trastorno inmunitario o cáncer, en el que la enfermedad o afección patológica está mediada por monocitos o macrófagos, neutrófilos, células T o células B, células dendríticas, o células epiteliales o endoteliales. En una realización adicional, la enfermedad está mediada por las CDP.

20 Otra realización de la presente invención proporciona un método de cribado de un compuesto que modula una actividad fisiológica, que comprende poner en contacto un compuesto candidato con un ratón nuligénico para p75^{NTR}; determinar la actividad fisiológica en el ratón nuligénico para p75^{NTR}; determinar la actividad fisiológica en un ratón nuligénico no puesto en contacto con el compuesto candidato; y comparar las actividades fisiológicas del ratón nuligénico para p75^{NTR} que se puso en contacto con el ratón nuligénico para p75^{NTR} que no se puso en contacto; así como el método anterior en el que la actividad fisiológica comprende una actividad inmunitaria; inflamación, hiperreactividad, o actividad proliferativa.

25 El p75^{NTR} en las células dendríticas plasmacitoides parece que funciona como un interruptor maestro de la regulación de respuestas inmunitarias. La modulación de las respuestas inmunitarias es la función principal de los adyuvantes vacunales. Por lo tanto, los agonistas y antagonistas del p75^{NTR} proporcionan un medio de nuevos adyuvantes.

30 La activación del p75^{NTR} en las CDP induce fuertemente respuestas inmunitarias Th2. Por lo tanto, los agonistas pueden reforzar las respuestas inmunitarias en vacunas dependientes de Th2. La respuesta inmunitaria dirigida es similar a las sales de aluminio, pero se basan sin inducir una inflamación local. Los agonistas de p75^{NTR} se pueden utilizar para remplazar los adyuvantes vacunales actuales o se podrían utilizar en combinación para reforzar adicionalmente una respuesta vacunal.

35 En consecuencia, hay una gran necesidad para la identificación de nuevos agonistas y antagonistas del p75^{NTR}. Estos nuevos agonistas y antagonistas del p75^{NTR}, en particular los agonistas del p75^{NTR} pueden utilizarse adicionalmente como adyuvantes vacunales.

40 La invención se refiere adicionalmente por lo tanto al uso de agonistas y antagonistas de la señalización de p75^{NTR}

como adyuvantes vacunales.

La invención proporciona adicionalmente composiciones vacunales que comprenden un agonista o antagonista de la señalización de p75NTR.

5 En otra realización, la invención se refiere al uso de una composición vacunal que comprende un agonista del p75NTR para la modulación de respuestas inmunitarias que comprende, pero no se limita a la estimulación de respuestas inmunitarias Th2, supresión de respuestas inmunitarias Th1, supresión de respuestas inmunitarias Th17, supresión de tolerancia inducida por células T reguladoras.

10 En otra realización más la invención se refiere al uso de una composición vacunal que comprende un antagonista del p75NTR para la modulación de respuestas inmunitarias que comprende, pero no se limita a la supresión de respuestas inmunitarias Th2, estimulación de respuestas inmunitarias Th1, estimulación de respuestas inmunitarias Th17, supresión de tolerancia inducida por células T reguladores y similares.

15 La invención proporciona adicionalmente activadores de células dendríticas, preferentemente de CDP, y una combinación de estos activadores con moduladores, es decir, agonistas o antagonistas, de la señalización de p75NTR.

20 Estas combinaciones de activadores de células dendríticas con agonistas o antagonistas de la señalización de p75NTR pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas, preferentemente en composiciones vacunales, para su uso en inmunoterapia.

Breve descripción de los dibujos

25 **La Figura 1** muestra el efecto de NGF sobre las CDP murinas durante la respuesta inmunitaria mediada por alérgenos. En el fluido del lavado broncoalveolar (BALF), el número de eosinófilos y linfocitos estaban aumentados significativamente cuando se llevaba a cabo la captación de OVA por las CDP en presencia de NGF en comparación con las CDP incubadas con OVA solo, mientras que el número de macrófagos disminuía (Fig. 1a, b). Las CDP cargadas con OVA se trataban con NGF se producía un aumento de la producción de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en el pulmón, en comparación con las CDP pulsadas con OVA en ausencia de NGF (Fig. 1c). Las secciones histológicas de pulmón de ratones que recibieron CDP cargadas con OVA presentaban un aumento de la inflamación perivascular y un aumento de la producción de mucus (Fig. 1d). El tratamiento de las CDP con NGF durante la captación de OVA potenciaba el fenotipo inflamatorio en el pulmón (Fig. 1d).

35 **La Figura 2** muestra los resultados de la investigación del papel del p75NTR expresado en las CDP murinas en el proceso de desencadenamiento de enfermedad en un modelo de ratón de asma alérgica mediada por OVA. Después de una provocación con un aerosol de OVA se analizaron los síntomas característicos de asma como la eosinofilia grave, inflamación pulmonar y producción intensa de mucus. Los ratones p75^{NTR+/+} (tipo silvestre) y los ratones p75^{NTR-/-} (nulgénicos) tratados con CDP p75^{NTR-/-} cargadas con OVA presentaban una reducción significativa del número de células inmunitarias en el BALF (linfocitos y eosinófilos) en comparación con los ratones que recibían CDP p75^{NTR+/+} (Figura 2a, b). La respuesta inmunitaria mediada por OVA daba lugar adicionalmente a un aumento de la secreción de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en el BALF de ratones tratados con CDP p75^{NTR+/+} pero no en los ratones que recibieron CDP p75^{NTR-/-} (Fig. 2c). La inflamación perivascular y la hiperplasia de células de Goblet en el pulmón disminuía en los ratones tratados con CDP p75^{NTR-/-} en comparación con los ratones tratados con CDP p75^{NTR+/+} (Fig. 2d, e).

50 **La Figura 3** muestra los resultados de la investigación del papel del p75NTR expresado en las CDP murinas en el proceso de respuesta inmunitaria estimulada por el oligodesoxinucleótido CPG *in vitro*. Las CDP murinas de la cepa p75^{NTR+/+} (tipo silvestre) expresan el receptor de neurotrofina p75NTR de baja afinidad, mientras que la cepa p75^{NTR-/-} (nulgénica) no (Fig. 3a, b). Las CDP p75^{NTR+/+} no expresan ninguno de los otros receptores Trk de neurotrofina (Fig. 3a; con tinción de anticuerpos: línea continua; sin tinción de anticuerpo: área sombreada). Al contrario que con las CDP p75^{NTR-/-}, la secreción de IFN α inducida por CPG A de las CDP p75^{NTR+/+} se redujo con la adición de NGF de una manera dependiente de la concentración, lo que ilustra una reducción de la respuesta Th1 (Fig. 3c). Las CDP p75^{NTR+/+} secretaban cantidades significativamente más altas de citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF α después de la estimulación con el oligodesoxinucleótido CPG B que induce Th2 (Fig. 3d). También la expresión del receptor tipo toll TLR9 expresado en las CDP estaba influenciado negativamente por la adición de NGF a las CDP p75^{NTR+/+} estimuladas por CPG A, mientras que p75^{NTR-/-} no presentaba diferencias en la expresión de TLR9 (Fig. 3e). La adición de NGF a las CDP p75^{NTR+/+} estimuladas por el oligodesoxinucleótido CPG A que induce una respuesta Th1 reacciona con una expresión reducida de MyD88 y TRAF6, y una activación reducida (fosforilación) de las proteínas de señalización IRF-3, IRF7, IKK y c-Jun (Fig. 3f). La coincubación de CDP p75^{NTR+/+} con NGF y oligodesoxinucleótido CPG que induce una respuesta Th2, proinflamatoria inducía un aumento de la expresión de MyD88 y TRAF3. También aumentó la

activación (fosforilación) de las proteínas de señalización IRF3, IRF7, IKK y c-Jun (Fig. 3g).

- La **Figura 4** muestra el efecto de NGF en la expresión de proteínas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I (proteínas del MHC clase I) y/o de Clase II (proteínas del MHC clase II) en las CDP co-estimuladas con los ligandos del receptor tipo toll CPG A y B. Las CDP p75^{NTR+/+} (tipo silvestre) reaccionan con una expresión disminuida de MHCII después de la adición de NGF a un cultivo que contiene CPG A que induce una respuesta de Th1 (Fig. 4a; sin NGF: línea continua, con NGF: línea sombreada). Las CDP estimuladas con CPG B que induce una respuesta Th2 presentaba un aumento adicional de la expresión de MHCII al añadir NGF al cultivo (Fig. 4b; sin NGF: línea continua, con NGF: línea sombreada). En comparación con las CDP p75^{NTR-/-} (nulgénicas), la adición de NGF a CDP p75^{NTR+/+} da lugar a un aumento adicional de la expresión de CPG B proinflamatorio inducido por MHC I (Fig. 4c, sin NGF: línea continua, con NGF: línea sombreada). Las CDP sin tinción se representan como un área de histograma sombreada.
- La **Figura 5** muestra la influencia de NGF sobre la secreción de citocinas IFN γ e IL-2 Th1 secretada por células T en un cocultivo de CDP murinas y células T. Las CDP se aislaron de entre cepas de ratón p75^{NTR+/+} (tipo silvestre) o p75^{NTR-/-} (nulgénicas). Las células T se aislaron de la cepa de ratón OTII que expresa receptores de células T específicos de ovoalbúmina peptídica. En presencia de CDP p75^{NTR+/+} que presentan la ovoalbúmina peptídica (OVA) a las células T, las células T secretan citocinas IFN γ (Fig. 5a) e IL-2 (Fig. 5b) de TH1. En comparación con el cocultivo con CDP p75^{NTR-/-}, las células T co-cultivadas con CDP de la cepa p75^{NTR+/+} reaccionan con disminución de la secreción de ambas citocinas Th1 al añadir NGF.
- La **Figura 6** muestra representaciones gráficas de IFN α (pg/ml) producido por CDP humanas activadas por, ODN 2216 (\blacktriangle) vs. ODN 2216 + NGF a 200 mg/ml (\square) (Fig. 6a). El IFN α secretado en el sobrenadante por las CDP activadas se determinó por ELISA. Los datos que se muestran son la media más menos el SEM (n = 20). El nivel de significancia se escogió de p < 0,05. Las diferencias significativas indicadas por (p = 0,0031) y ** como se determinó por el ensayo t emparejado con el ensayo de student (de dos colas). Además, el bloqueo del receptor p75NTR por el péptido sintético PEP5 en presencia de NGF daba como resultado el aumento de secreción significativamente de IFN α (Fig. 6b). Los datos que se muestran son la media más menos el SEM (n = 23) en el panel de la izquierda, y (n = 9) en el panel de la derecha. El nivel de significancia indicado por *, y ** se determinó por ensayo T emparejado con student (de dos colas); ns = no significativo.
- La **Figura 7** muestra la influencia del NGF en la proliferación de células T y la secreción de citocinas proinflamatorias en un cocultivo de células T y CDP aisladas de pacientes alérgicos. Al añadir NGF al cocultivo, las celas T presentaban un aumento de proliferación en presencia del alérgeno específico (Fig. 7a). Las células T también reaccionan con un aumento de secreción de citocinas proinflamatorias IL-2 e IL-5 (Fig. 7b). Los valores se muestran como la medio con el SEM de cuatro donantes alérgicos diferentes (n = 4). Los valores se compararon utilizando el método de comparación múltiple ANOVA de una vía (de Turkey). Las diferencias se consideraban significativas cuando p < 0,05. Ag: alérgeno.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término “p75NTR” en el presente documento se refiere al receptor del factor de crecimiento de nervios de baja afinidad (también llamado LNGFR, receptor p75 de neurotrofina, TNFRSF16 (superfamilia del TNFR, Miembro 16), Gp80-LNGFR, p75, p75ICD, Miembro 16, CD271 o receptor NGF). El “p75NTR” es uno de los dos tipos de receptor para las neurotrofinas, una familia de factores del crecimiento proteicos que estimulan a las células neuronales a sobrevivir y diferenciarse. El “p75NTR” como se utiliza en el presente documento abarcará el p75NTR proteico como se expresa habitualmente en las células de mamífero, pero también todas las variantes de corte y empalme del mismo. Las variantes de corte y empalme de p75NTR se pueden formar por “corte y empalme alternativo”, un proceso regulado durante la expresión genética que da como resultado un único gen que codifica múltiples proteínas. Durante el proceso del corte y empalme alternativo, los exones particulares de un gen se pueden incluir en o excluirse del ARN mensajero (ARNm) procesado finalmente, que se produce de ese gen. En consecuencia, las proteínas traducidas de los ARNm cortados y empalmados alternativamente contendrán diferencias en su secuencia de aminoácidos y, a menudo, en su estructura. Preferentemente, de acuerdo con la presente invención, el p75NTR proteico está codificado por el gen que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO. 4 (ID del gen 4804; referencia de secuencia del NCBI NM_002507.3). Más preferentemente, el p75NTR proteico como se utiliza en el presente documento tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 3 (N.º de acceso Swiss-Prot P08138.1).

“Activación”, “estimulación” y “tratamiento”, como se aplica a células o a receptores puede tener el mismo significado, por ejemplo, activación, estimulación o tratamiento de una célula o receptor con un ligando, agonista o antagonista a menos de que se indique otra cosa por el contexto o explícitamente.

“Activación” se puede referir a activación celular según se regula por mecanismos internos, así como por factores externos o ambientales.

5 “Ligando” engloba ligandos naturales y sintéticos, por ejemplo, citocinas, variantes de citocinas, análogos, muteínas, y composiciones de unión derivadas de anticuerpos. “Ligando” también engloba moléculas pequeñas, por ejemplo, miméticos peptídicos de citocinas, miméticos peptídicos de anticuerpos, ácidos nucleicos y miméticos de ácidos nucleicos.

10 Un “agonista” es un compuesto químico que se une a un receptor y activa el receptor para producir una respuesta biológica. Mientras que un agonista causa una acción, un antagonista bloquea la acción del agonista y un agonista inverso causa una acción opuesta a la del agonista.

15 Un “antagonista” es un ligando que bloquea las respuestas mediadas por el agonista al unirse a un receptor. La unión de un “antagonista” altera la interacción e inhibe la función de un “agonista” en los receptores. Los “antagonistas” median sus efectos uniéndose al sitio activo o a sitios alostéricos de los receptores, o pueden interactuar en sitios de unión únicos normalmente no implicados en la regulación biológica de la actividad del receptor. La “actividad antagonista” puede ser reversible o irreversible. La mayoría de los fármacos antagonistas consiguen su potencia compitiendo con los ligandos o sustratos endógenos en sitios de unión definidos estructuralmente en los receptores.

20 “Respuesta”, por ejemplo, de una célula, tejido, órgano, u organismo, engloba un cambio en el comportamiento bioquímico o fisiológico, por ejemplo, la concentración, densidad, adhesión o migración con un compartimento biológico, tasa de expresión genética, o estado de diferenciación, cuando el cambio se correlaciona con activación, estimulación, o tratamiento, o con mecanismos internos tal como la programación genética.

25 “Actividad” de una molécula puede describir o referirse a la unión de la molécula a un ligando o a un receptor, a actividad catalítica; o la capacidad para estimular la expresión genética o señalización celular, diferenciación, o maduración; a la actividad antigénica, a la modulación de actividades de otras moléculas, y similares. “Actividad” de una molécula también puede referirse a la actividad de modulación o mantenimiento de interacciones célula a célula, por ejemplo, adhesión o actividad del mantenimiento de la estructura de una célula, por ejemplo, las membranas celulares o el citoesqueleto.

30 “Actividad proliferativa” engloba una actividad que promueve, que es necesaria para, o que se asocia específicamente con, por ejemplo, división celular normal, así como cáncer, tumores, displasia, transformación celular, metástasis y angiogénesis.

35 “Administración” y “tratamiento”, como se aplica al tratamiento de un sujeto humano, sujeto de investigación, sujeto veterinario, animal, o célula, se refiere a poner en contacto un agente o composición farmacéutica, terapéutica, de diagnóstico, o un placebo, con el sujeto humano, animal, o célula. El tratamiento de una célula engloba el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un fluido, en el que el fluido está en contacto con la célula.

40 “Administración” y “tratamiento” también engloba el tratamiento *ex vivo*, por ejemplo, el tratamiento *ex vivo* de una célula, tejido, u órgano, seguido por el contacto de la célula, tejido u órgano con el sujeto o animal, incluso cuando el agente o composición se ha metabolizado, alterado, degradado, o eliminado, durante o después del tratamiento *ex vivo*.

45 “Compuesto candidato” o “compuesto de ensayo” se refiere, por ejemplo, a una molécula, complejo de moléculas, o mezcla de moléculas, en el que el compuesto candidato se utiliza en el desarrollo o identificación de un agente terapéutico o diagnóstico. El ensayo o cribado de un compuesto candidato se utiliza para determinar si el compuesto puede ser útil como terapéutico o diagnóstico. Los “compuestos candidatos” engloban, por ejemplo, polipéptidos, anticuerpos, productos naturales, químicos sintéticos, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos con un segundo terapéutico o diagnóstico, o un vehículo, diluyente, estabilizador, o excipiente.

50 “Trastorno” o “enfermedad” se refiere a un estado patológico, o una afección que se correlaciona con o predispone a un estado patológico. En particular, “trastorno” o “enfermedad” es una deficiencia del estado normal del animal vivo o el cuerpo humano o una de sus partes que interrumpe o modifica la actuación de las funciones vitales, se manifiesta normalmente por signos y síntomas característicos, y es una respuesta a factores ambientales (tal como malnutrición, riesgos industriales, o el clima), a agentes infecciosos específicos (tales como gusanos, bacterias o virus), defectos inherentes del organismo (como anomalías genéticas o funcionalidad defectuosa del sistema inmunitario), o a combinaciones de estos factores.

55 “Trastorno infeccioso” o “enfermedades infecciosas” se refiere, por ejemplo, un trastorno que resulta de un microbio, bacteria, parásito, hongo patógeno, virus y similares, así como a una respuesta inmunitaria inapropiada, ineficaz, o patológica frente al trastorno.

60 “Trastorno oncogénico” engloba un cáncer, célula transformada, tumor, displasia, angiogénesis, metástasis, y

similares, así como a una respuesta inmunitaria inapropiada, ineficaz, o patológica frente al trastorno.

“Cantidad eficaz” significa, por ejemplo, una cantidad de un agonista, antagonista de p75NTR, o compuesto o composición de unión suficiente para mejorar un síntoma o signo de un trastorno, afección, o estado patológico.

5 “Expresión” se refiere a una medida del ARNm o polipéptido codificado por un gen específico. Las unidades de expresión puede ser una medición, por ejemplo, del número de moléculas de ARNm o polipéptido/mg de proteína en una célula o tejido, o en un extracto celular o extracto tisular. Las unidades de expresión pueden ser relativas, por ejemplo, una comparación de señal de mamíferos de control y experimentales o una comparación de seles con un reactivo que sea específico para el ARNm o polipéptido frente a un reactivo que no es específico.

10 “Trastorno inflamatorio” o “enfermedad inflamatoria” significa un trastorno o afección patológica en los que la patología da como resultado, en todo o en parte, un aumento en el número y/o un aumento en la activación de células del sistema inmunitario, por ejemplo, células T, células B, monocitos, macrófagos, macrófagos alveolares, células dendríticas, células NK, células NKT, neutrófilos, eosinófilos o mastocitos.

15 Un “trastorno inmunitario” o “enfermedad inmunitaria” es una disfunción del sistema inmunitario. Estos trastornos se desarrollan debido a los componentes del sistema inmunitario que están afectados, o debido a que el sistema inmunitario esta sobre-activado o bajo-activado. Además, estos trastornos pueden ser congénitos o adquiridos.

20 “Inmunoterapia” significa el tratamiento de una enfermedad induciendo, aumentando, o suprimiendo una respuesta inmunitaria. Las inmunoterapias diseñadas para provocar o amplificar una respuesta inmunitaria se clasifican como inmunoterapias de activación, mientras que las inmunoterapias que la reducen o suprimen se clasifican como inmunoterapias de supresión.

25 “Inactivación genética” (KO) se refiere a la reducción parcial o completa de la expresión de al menos una parte de un polipéptido codificado por un gen, por ejemplo, el gen p75NTR, en el que el gen es endógeno de una célula única, células seleccionadas, o todas las células de un animal tal como un mamífero. KO también engloba realizaciones en las que la función biológica está reducida, pero en las que la expresión no está necesariamente reducida, por ejemplo, un polipéptido p75NTR que comprende un polipéptido p75NTR expresado que contienen un péptido, oligopéptido, o polipéptido de inactivación insertado. Las alteraciones en una secuencia codificante o una secuencia reguladora están englobadas en la técnica de inactivación. La célula o el mamífero puede ser “nuligénico heterocigoto”, en la que un alelo del gen endógeno se ha alterado. De manera alternativa, la célula o el mamífero puede ser “nuligénico homocigoto” en el que ambos alelos del gen endógeno se han alterado. “Nuligénico homocigoto” no pretende limitar la alteración de ambos alelos a técnicas idénticas o resultados idénticos en el genoma. Se incluye en el alcance de la presente invención un mamífero en el que uno o ambos alelos p75NTR se han inactivado.

30 “Atenuación genética” (KD) se refiere a una reducción parcial de al menos una parte de un polipéptido codificado por un gen, por ejemplo, el gen p75NTR, en el que el gen es endógeno de una línea celular, una única célula, células seleccionadas, o todas las células de un animal tal como un mamífero. La KD se consigue, por ejemplo, o la expresión de un ARNip/ARNhp.

35 “Transgénico” se refiere a un cambio genético, producido por una técnica de modificación genética que se hereda establemente. Los métodos, células, y animales transgénicos incluyen cambios genéticos que resultan del uso de una técnica de inactivación genética, una técnica de inserción génica o cualquier otra técnica convencional para la producción de transgénicos.

40 Un “marcador” se refiere al fenotipo de una célula, tejido, órgano, animal, por ejemplo, un ratón, o un sujeto humano. Un marcador celular de superficie se refiere a una molécula que se localiza en la membrana plasmática de un tipo celular específico o incluso un número limitado de tipos celulares. Un marcador intracelular se refiere a una molécula que se localiza dentro de la célula de un tipo celular específico o incluso un número limitado de tipos de células. Normalmente se utilizan en la identificación de tipos celulares. Los marcadores se utilizan para detectar células, por ejemplo, durante la purificación, cuantificación, migración, activación, maduración, o desarrollo celular, y se puede utilizar para estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Un marcador de activación es un marcador que se asocia con la

45 activación celular.

50 “Sensibilidad”, por ejemplo, sensibilidad de un receptor para un ligando, los medios que unen un ligando al receptor resultan en un cambio detectable en el receptor, o en eventos o moléculas asociadas específicamente con el receptor, por ejemplo, un cambio conformacional, fosforilación, naturaleza o cantidad de proteínas asociadas con el receptor, o cambio en la expresión genética o proteica mediada o asociada con el receptor.

55 “Receptor soluble” se refiere a receptores que son hidrosolubles y existen, por ejemplo, en los fluidos extracelulares, fluidos intracelulares, o asociados débilmente con una membrana. Un receptor soluble se refiere adicionalmente a receptores que se modifican para ser hidrosolubles.

60 “Especificidad de unión”, “selectividad de unión”, y similares, se refiere a una interacción de unión entre un ligando predeterminado y un receptor predeterminado que hace posible que se distinga entre el ligando predeterminado y

5 otros ligandos, o entre el receptor predeterminado y otros receptores. Que se une “específicamente” o “selectivamente”, cuando se refiere a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno, u otro para de unión, indica una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas. Por lo tanto, en condiciones determinadas, un ligando especificado se une a un receptor particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra.

Una “célula primaria” es una célula que se deriva directamente del cuerpo humano o animal.

10 “oligodesoxinucleótidos CPG” (o CPG ODN, “CPG” corto) son moléculas de ADN sintético de cadena sencilla corto que contiene un desoxinucleótido citosina trifosfato seguido por un desoxinucleótido guanina trifosfato.

15 Un “gen” engloba la región codificante de un polipéptido y cualquier secuencia codificante, por ejemplo, promotores, operadores, amplificadores, intrones, sitios receptores y donantes de corte y empalme, señales de inicio y parada de la traducción y transcripción. La región codificante puede comprender un exón continuo, o puede comprender más de un exón, es decir, puede estar interrumpido por uno o más intrones. Un “gen” puede englobar una o más fases de lecturas abiertas (ORF).

20 Una “vacuna” es una preparación biológica que mejora la inmunidad contra una enfermedad particular. Una vacuna contiene normalmente un ingrediente que se parece a un microorganismo causante de una enfermedad y a menudo se fabrica con formas inactivadas del microorganismo, sus toxinas o una de sus proteínas de superficie. El ingrediente estimula el sistema inmunitario del cuerpo para reconocer el ingrediente como ajeno, lo destruye y lo memoriza para futuras infecciones. Las vacunas pueden ser profilácticas (por ejemplo, para prevenir o mejorar los efectos de una infección futura por un microorganismo patógeno), o terapéuticas (por ejemplo, vacunas contra el cáncer).

25 Un “adyuvante” es un agente farmacológico y/o inmunológico que modifica el efecto de otros agentes. Los adyuvantes son entidades químicas orgánicas o inorgánicas, macromoléculas o células completas de ciertos microorganismos patógenos inactivados, que aumentan la respuesta inmunitaria a un antígeno. Se pueden incluir en una vacuna para aumentar la respuesta inmunitaria a un antígeno suministrado a un sujeto, minimizando de esta manera la cantidad de material ajeno inyectado. Los adyuvantes pueden aumentar la respuesta inmunitaria al antígeno de diferentes maneras, por ejemplo, por activación de la señalización del receptor tipo Toll (TLR), extendiendo la presencia de un antígeno en la circulación sanguínea, mejorando la absorción del antígeno por las células presentadoras de antígeno, activando macrófagos y linfocitos y/o aumentando la producción de citocinas.

35 **Realizaciones preferidas de la invención**

La presente invención proporciona un ensayo basado en células que comprende células primarias humanas o animales o líneas celulares que expresan el receptor del factor de crecimiento de nervios p75NTR, caracterizado porque se mide el efecto del agonismo o antagonismo de la señalización de p75NTR endicha célula o línea celular. En una realización preferida, la presente invención proporciona un ensayo basado en células que comprende células primarias humanas o animales o líneas celulares que expresan el receptor del factor de crecimiento de nervios p75NTR y/o al menos una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en TLR4, TLR9, TLR7, TRAF3 y TRAF6 y moléculas de señalización de la ruta del receptor tipo Toll, que comprenden, pero no se limitan a MyD88, IRAK 1 a 4, IRF3, IRF7, en el que se mide el efecto del agonismo o antagonismo de la señalización de p75NTR en dicha célula o línea celular.

45 Adecuadamente, las células primarias utilizadas en el ensayo de la invención son células dendríticas que comprenden, pero no se limitan a células dendríticas plasmacitoides (CDP). Adicionalmente de manera adecuada, las líneas celulares utilizadas en el ensayo de la invención se derivan de células dendríticas plasmacitoides. En una realización preferida, en el ensayo de la invención se utilizan células o líneas celulares transgénicas, que se han modificado genéticamente para que sobreexpresen p75NTR y/o receptores tipo Toll, TLR9 y/o TLR7, o modificadas para dar lugar a una expresión reducida de los mismos utilizando ARNip, ARNhp o morfolinos.

50 La invención proporciona adicionalmente el uso de un ensayo basado en células en métodos de cribado de sustancias que ejercen efectos agonistas y antagonistas sobre la señalización p75NTR.

55 En una realización adicional, la invención proporciona un método de cribado de agonistas y antagonistas de la señalización por p75NTR.

En una realización preferida, la invención proporciona un método de cribado para agonistas y antagonistas de la señalización por p75NTR que comprende las etapas de:

- 5 • Poner en contacto una célula primaria animal o humana o línea celular que expresa el receptor del factor de crecimiento de nervios p75NTR con una sustancia de ensayo debajo;
- Incubar dicha célula primaria animal o humana o línea celular durante un periodo de tiempo, que es suficiente para efectuar la señalización por p75NTR.
- Determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre la célula primaria o línea celular;
- 10 • Comparar el efecto de la sustancia de ensayo en la célula primearía o línea celular con que contacta y las células de control, y
- Seleccionar una sustancia de ensayo que agoniza o antagoniza con la señalización con p75NTR.

Adecuadamente, las células de control o líneas celulares son células primarias, más adecuadamente CDP.

- 15 La etapa de poner en contacto una célula primaria humana o animal o una línea celular que expresa el receptor del factor de crecimiento de nervios p75NTR, con una sustancia de ensayo, se lleva a cabo preferentemente en condiciones que permitan la interacción de la sustancia de ensayo con el p75NTR proteico. Más preferentemente, la etapa de poner en contacto una célula primaria humana o animal o línea celular que expresa el receptor del factor de crecimiento de nervios p75NTR, con una sustancia de ensayo, se puede llevar a cabo en condiciones que permitan la
- 20 interacción de la sustancia de ensayo con el p75NTR proteico y/o la interacción de la sustancia de ensayo con factores corriente arriba o corriente abajo en la ruta de señalización de p75NTR.

Las células de control son preferentemente células o líneas celulares que no se han puesto en contacto con el agente de ensayo.

- 25 Más preferentemente, las células de control son células o líneas celulares que no expresan el p75NTR o que expresan p75NTR en cantidades reducidas. Dichas células o líneas celulares de control que no expresan p75NTR o que expresan p75NTR en cantidades reducidas pueden ponerse en contacto opcionalmente con la sustancia de ensayo.

- 30 En una realización adicional, las celas primarias o líneas celulares se preactivan antes o durante su uso en los métodos de ensayo y cribado de la invención. Son adecuados para su uso en la preactivación de las células primarias y líneas celulares los agonistas de la señalización por TLR9. Los agonistas de la señalización por TLR9 son, por ejemplo, ADN bacteriano, CPG ODN Clase A, tal como ODN 1585, ODN 2216, ODN 2336; CPG-ODN Clase B tales como ODN BW006, ODN D-SL01 ODN 1668, ODN 1826, ODN 2006, ODN 2007 y CPG_ODN Clase C, tales como ODN D-SL03,
- 35 ODN 2395, ODN M362.

La sustancia de ensayo que se utiliza en los métodos de ensayo y/o cribado de la invención puede ser un agonista de p75NTR natural, tal como el factor de crecimiento de nervios (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4) o neurotrofina-5 (NT-5), o una combinación de los mismos.

- 40 La sustancia de ensayo que se utiliza en los métodos de ensayo y/o cribado de la invención también puede ser un precursor de un agonista de p75NTR, tal como pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT-3, pro-NT-4, pro-NT5 o una combinación de los mismos.

- 45 El método se puede llevar a cabo en presencia o ausencia de un ligando natural del p75NTR, tal como un agonista de p75NTR o un antagonista de p75NTR. Si el método se lleva a cabo en presencia de un ligando natural del p75NTR, el método se lleva a cabo adecuadamente en condiciones que permitan la interacción de la sustancia con el p75NTR proteico o la interacción de la sustancia de ensayo con dicho ligando natural de p75NTR.

- 50 El efecto antagonista o agonista de la sustancia de ensayo sobre la señalización de p75NTR en los métodos de ensayo y/o cribado de la invención se pueden medir basándose en el análisis de expresión de citocinas. Las citocinas adecuadas para el análisis de expresión en los métodos de ensayo y/o cribado de la invención comprenden, por ejemplo, el interferón alfa (IFN α), factor alfa de necrosis tumoral (TNF α), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-13 (IL-13) y otras citocinas. Al igual que los efectos observados en el NGF se espera
- 55 que un agonista inhiba la expresión de la citocina Th1 IFN α , mientras que aumente la expresión de citocinas Th2 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 y TNF α . Se esperaría que los antagonistas inhiban los efectos agonistas descritos de las Neurotrofinas, cuando la Neurotrofina se puede derivar de la producción autocrina por la célula de ensayo o suplementada externamente. Se espera que un antagonista cambie la producción de citocinas a un perfil Th1 con fuerte inducción de IFN α y una supresión o disminución de la expresión de citocinas Th2 inflamatorias, por ejemplo,
- 60 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 y TNF α .

El efecto antagonista o agonista de la sustancia de ensayo sobre la señalización de p75NTR en los métodos de ensayo y/o cribado de la invención se pueden medir adicionalmente basándose en el análisis de la cascada de señalización intracelular, por ejemplo, sus proteínas en cuanto al nivel de expresión y su activación, por ejemplo, fosforilación,

- 65 cascadas de señalización intracelular adecuadas para el análisis en los métodos de ensayo y/o cribado de la invención

comprende por ejemplo, pero no se limita a la activación de factores asociados con el receptor de TNF 3 (TRAF3) y 6 (TRAF6), la activación del modulador esencial NF-kappa-B (NEMO), la activación de la cinasa IκB (IKK), la activación del factor regulador del interferón 3 (IRF3) y 7 (IRF7), la activación de NF-κB (factor nuclear 'potenciador de cadena ligera kappa' de células B activadas) y similares. Al igual que los efectos observados con NGF se espera que un agonista inhiba la activación de IRF3 e IRF7, mientras que se activan IKK y NF kappa (rutas canónica y no canónica). Un antagonista inhibiría los efectos agonistas descritos de Neurotrofina cuando la Neurotrofina se puede derivar de la producción autocrina por la célula de ensayo o suplementada externamente.

El efecto antagonista o agonista de la sustancia de ensayo de la señalización de p75NTR en los métodos de ensayo y/o cribado de la invención se pueden determinar adicionalmente basándose en la expresión de un marcador de superficie y marcador intracelular. Los marcadores de superficie adecuados para el análisis de expresión en los métodos de ensayo y/o cribado de la invención comprenden por ejemplo, proteínas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I (proteínas del MHC clase I) y/o de Clase II (proteínas del MHC de clase II), CD80, CD83, CD86, B100d antígeno de células dendríticas 2 (BDCA2), B100d antígeno de células dendríticas 4 (BDCA4), interleucina 3 receptor alfa (CD 123), TLR7, TLR9 y similares. Basándose en los efectos observados con NGF se espera que un agonista inhiba la regulación positiva de moléculas del MHC sobre la superficie celular en entornos que favorecen reacciones Th1, se espera que los agonistas en entornos que favorecen reacciones Th2 aumenten la expresión en superficie de moléculas del MHC. Un antagonista debería inhibir los efectos agonistas de Neurotrofina descritos, cuando la Neurotrofina se puede derivar de la producción autocrina de la célula de ensayo o suplementada externamente.

El efecto antagonista o agonista de la sustancia de ensayo sobre la señalización de p75NTR en los métodos de ensayo y/o cribado de la invención se puede determinar adicionalmente basándose en la medición de la captación, procesamiento intracelular y presentación de antígenos externos. Los antígenos externos adecuados para el análisis en los métodos de ensayo y/o cribado de la invención comprenden por ejemplo los oligodesoxinucleótidos CPG, imiquod, albúmina, preparaciones víricas, preparaciones bacterianas, péptidos artificiales o purificaciones de proteínas y similares. Un agonista da lugar a un aumento de la captación de antígenos externos por las CDP y un aumento de presentación de epitopos antigénicos sobre moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II para las células efectoras, dando como resultado una respuesta de célula efectora intensificada. Un antagonista da lugar a una reducción de la captación y presentación de antígenos, limitando por lo tanto la respuesta de la célula efectora.

Las células primarias o líneas celulares que expresan p75NTR y que se utilizan en los métodos de ensayo y/o cribado de la invención, también se pueden coincubar con otras células que tienen un papel central en las respuestas inmunitarias mediadas por células. La preferidas para su uso en dicha coincubación son las células T.

En una realización preferida, la invención proporciona un método de cribado para agonistas y antagonistas de la señalización de p75NTR que comprende las etapas de:

- Poner en contacto una célula primaria humana o animal o una línea celular que expresa el receptor del factor de crecimiento de nervios p75NTR, que se coincuban con células T, con una sustancia de ensayo;
- Incubar dicha célula primaria humana o animal o línea celular y dichas células T durante un periodo de tiempo, que sea suficiente para efectuar la señalización de p75NTR;
- Determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre la célula primaria o la línea celular y/o sobre las células T;
- Comparación del efecto de la sustancia de ensayo en la célula primaria o línea celular y/o células T que se pusieron en contacto con células de control; y
- Seleccionar una sustancia de ensayo que agoniza o antagoniza con la señalización de p75NTR.

El método se puede llevar a cabo en presencia o ausencia de un ligando natural de p75NTR, tal como un agonista de p75NTR o un antagonista de p75NTR. Si el método se lleva a cabo en presencia de un ligando natural de p75NTR, el método se lleva a cabo adecuadamente en condiciones que permitan la interacción de la sustancia con el p75NTR proteico o la interacción de la sustancia de ensayo con dicho ligando natural de p75NTR.

La etapa de poner en contacto una célula primaria humana o animal o una línea celular que exprese el receptor del factor de crecimiento de nervios p75NTR, con una sustancia de ensayo, se lleva a cabo preferentemente en condiciones que permitan la interacción de la sustancia de ensayo con el p75NTR proteico. Más preferentemente, la etapa de poner en contacto una célula primaria humana o animal o la línea celular que expresa el receptor del factor de crecimiento de nervios p75NTR, con una sustancia de ensayo, se puede llevar a cabo en condiciones que permitan la interacción con la sustancia de ensayo con el p75NTR proteico y/o la interacción de la sustancia de ensayo con factores corriente arriba o corriente abajo de la ruta de señalización del p75NTR.

Las células de control son preferentemente células o líneas celulares que no se han puesto en contacto con el agente de ensayo.

En una realización preferida, se utilizan células de control que no expresan naturalmente el p75NTR. Esto permite que el efecto de la sustancia de ensayo de la señalización de p75NTR puede atribuirse directamente y sin ambigüedades

a la diana p75NTR. Además, se pueden reconocer posibles efectos secundarios de la sustancia de ensayo sobre otras dianas. En consecuencia, los agentes de ensayo que presentan un efecto agonista o antagonista sobre la señalización de p75NTR con alta especificidad y sin efectos secundarios no deseados se pueden cribar y seleccionar para un posterior desarrollo.

5 En una realización adicional, las células dendríticas plasmacitoides en las que el p75NTR está inactivado o atenuado, se utilizan como células de control. De la misma manera, el nivel de p75NTR en las células de control puede reducirse de otra manera. Más adecuado de acuerdo con la invención es el uso de células dendríticas plasmacitoides, en las que la expresión de p75NTR está reducida o inhibida, como células de control.

10 Dichas células de control o líneas celulares que no expresan naturalmente p75NTR o en las que el p75NTR está inactivado o atenuado pueden ponerse en contacto opcionalmente con la sustancia de ensayo.

15 El efecto antagonista o agonista de la sustancia de ensayo sobre la señalización de p75NTR en los métodos de ensayo y/o cribado de la invención, puede solo o adicionalmente con los parámetros mencionados anteriormente, determinarse adicionalmente basándose en la estimulación de las células T coincubadas. La activación de células T se puede detectar adecuadamente determinando la expresión de citocinas de células T, tal como, por ejemplo, quimiocinas, interferones, interleucinas, linfocinas y factor de necrosis tumoral; la proliferación de células T; inducción de clones de células T específicos de un antígeno y/o inducción de células T reguladoras.

20 La proliferación de células T se puede medir como se describe en el presente documento en el Ejemplo 4.

25 La inducción de clones de células T específicas del antígeno se puede medir por su secreción de citocinas específicas o por su proliferación. Al ponerse en contacto con los antígenos, es decir, en cocultivos con las células presentadoras de antígenos (es decir, las células dendríticas), los clones de células T secretan un patrón de citocinas. Las citocinas específicas para una respuesta Th1 son IFN γ e IL-2, para Th2, IL-5, IL-6 e IL-13, para Th17, IL-21, e IL-22 y para las células T reguladoras IL-9, IL-10 y TGF β . La secreción de citocinas de células T se puede medir con un ELISA, matrices de perlas citométricas (CBA) o análisis ELISPOT. La proliferación de células T se puede medir por cuantificación de la intensidad de un colorante fluorescente incorporado por las células T (es decir, CFSE) y su pérdida de intensidad durante la proliferación de células T utilizando citometría de flujo.

35 La inducción de células T reguladoras se puede determinar por ensayos de cocultivo con CDP (Gehrie et al., Methods Mol Biol, 2011). En resumen, las células T intactas se aislaron del bazo de ratón o sangre periférica humana mediante separación con perlas magnéticas (CD4+CD25-). Las células T se co-cultivaron con CDP en presencia de un mAb anti-CD3 (150 ng/ml), 10 ng/ml de IL-2, y 10 ng/ml de TGF β . Después de 96 horas se tiñeron las células T con anticuerpos contra CD4, CD25 y FoxP3 (intracelular) para determinar el número de células T reguladoras activadas. En paralelo, la secreción de citocinas (es decir IL-10) de células T reguladoras se puede medir en el sobrenadante por ELISA.

40 Para investigar el efecto antagonista o agonista de la sustancia de ensayo sobre la señalización de p75NTR *in vivo*, se pueden administrar células primarias o líneas celulares, que expresan p75NTR y/o al menos uno de TLR4, TLR7 y/o TLR9 a modelos animales. La sustancia de ensayo se puede administrar a los mismos animales antes, junto con o después de la administración de las células primarias o líneas celulares. Además, las células primarias o líneas celulares se pueden también pre-incubar con la sustancia de ensayo *in vitro* antes de la administración a los modelos animales.

50 En una realización adicional de la presente invención, las células primarias o líneas celulares, que expresan p75NTR y/o al menos un de TLR4, TLR7 y/o TLR9, se puede utilizar *in vivo*, es decir, administrarse a modelos animales, que son específicos de enfermedades inmunitarias, inflamatorias o proliferativas. Los modelos animales adecuados se seleccionan de entre, por ejemplo, modelos de asma alérgica inducida por OVA, otros modelos de enfermedades alérgicas, modelos EAE en ratón o rata, modelos de diabetes, modelos SLE, modelos de trasplante, modelos de GVHD, modelos tumorales y similares.

55 Los modelos adecuados de asma alérgica son, por ejemplo, ratones BALB/c y C57BL/6. Los ratones BALB/c montan normalmente respuestas inmunitarias dominadas por Th2, y la inducción de parámetros de respuestas alérgicas tales como IgE específica de alérgeno, hiper-respuesta de vías aéreas (AHR), e inflamación eosinofílica de vías aéreas es robusta. Por el contrario, los ratones C57BL/6 presentan respuestas inmunitarias dominadas por Th1, y tienen limitaciones en el desarrollo de repuestas alérgicas de vías aéreas en comparación con los ratones BALB/c especialmente en el desarrollo de respuestas de IgE específicas del alérgeno y la respuesta de las vías aéreas a la metacolina inhalada. Sorprendentemente, en respuesta al desafío con alérgeno, por ejemplo, a la ovoalbúmina (OVA), no desarrollan una repuesta eosinofílica robusta en el BALF, y en el tejido tiende a acumularse más eosinófilos en el parénquima que alrededor de las vías aéreas, a diferencia de los ratones BALB/c en los que los eosinófilos se acumulan alrededor de las vías aéreas.

65 La encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) es el modelo experimental que se utiliza más comúnmente para la enfermedad desmielinizante inflamatoria humana, la esclerosis múltiple (MS). La EAE es una afección compleja

en la que la interacción entre varios mecanismos inmunopatológicos y neuropatológicos dan lugar a una aproximación de las características patológicas clave de MS: inflamación, desmielinización, pérdida axonal y gliosis. Los mecanismos contra-reguladores de resolución de la inflamación y remielinización también se producen en la EAE, lo que, por lo tanto, también puede servir como modelo para estos procesos. Modelos *in vivo* bien conocidos de EAE son por ejemplo el ratón C57BL/6, en el que la inmunización con MOG35-55 en adyuvante completo de Freund (CFA) puede inducir una forma de EAE sostenida monofásica o crónica. La primera se caracteriza por áreas multifocales, confluentes de infiltración inflamatoria mononuclear y desmielinización de la sustancia blanca periférica de la médula espinal. Los macrófagos y células T CD4+ son los tipos celulares principales en el infiltrado inflamatorio. Otros modelos de EAE son los ratones SJL/J (inmunización con PLP139-151), la rata Lewis (EAE activa y pasiva inducida por proteína básica de mielina (MBP) o transferencia de células T específicas de MBP), y la rata Agutí Oscura (DA) (tejido singénico del tejido de médula espinal o el MOG de rata recombinante se puede utilizar para inducir la EAE).

De particular interés para la presente invención son los modelos animales de diabetes inmunomediada (Tipo 1A). Los modelos susceptibles a la diabetes tipo 1 espontánea incluye el ratón diabético no obeso (NOD), la rata con tendencia a Diabetes BioBreeding (BB-DP), la sub-línea con tendencia a diabetes Komada (KDP) de la rata Lew.I.WRI Long-Evans Tokushima Lean y la rata Lew.IARI/Ztm. Existen múltiples modelos inducidos experimentalmente de diabetes tipo 1 disponibles que incluyen: 1) ratones retrogénicos y transgénicos (Tg) en el receptor de célula T (TCR) con los receptores de células T de clones diabetogénicos de origen natural 2) expresión de neo-antígenos (Ag) bajo el control de un promotor de insulina de rata (RIP) para establecer la expresión del neo-autoantígeno que puede ser la diana de autoinmunidad, y 3) la expresión dirigida por IRP de moléculas co-estimulantes de las células beta. Los ratones con inactivación de autoantígenos de isletas supuestos han permitido el ensayo directo de la significación patógena de moléculas diana específicas. Las cepas de ratones con mutaciones de genes asociadas con la diabetes tipo 1 en el ser humano (FoxP3 y AIRE) se están estudiando (incluyendo una mutación AIRE "humano" dominante autosómica).

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria que afecta múltiples sistemas orgánicos. El LES se caracteriza por la pérdida de tolerancia a células B y T a uno o más autoantígenos, dando como resultado una inflamación polisistémica. Las cepas de ratón que se utilizan más comúnmente que desarrollan una enfermedad espontánea incluyen la F1 del cruce entre ratones Nueva Zelanda Negros y Nueva Zelanda Blancos (NZB/W), ratones MRL/PR, y ratones BXSB/Yaa. Las manifestaciones clínicas e inmunológicas comunes del LES en estas 3 cepas incluyen células B y T hiperactivas (su presencia e interacciones entre ellas son necesarias para la enfermedad), los altos títulos de varios autoanticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares, el aclaramiento defectuoso de complejos inmunitarios, y glomerulonefritis inmunitaria fatal.

El factor limitante para el trasplante satisfactorio de células madre hematopoyéticas (HSCT) es la enfermedad del injerto contra el huésped (GvHD), un trastorno después del trasplante que resulta del ataque inmunomediado en el tejido receptor por las células T del donante contenidas en el trasplante. La secuencia de eventos que da lugar al desarrollo de la GvHD se ha definido extensamente utilizando modelos de ratón. El trabajo anterior establecía que la alorreactividad de las células T es la causa subyacente de la enfermedad (Korngold y Sprent, 1978; Sprent et al., 1986). La patología de los modelos de ratón de GvHD aguda y crónica se basa en la alorreactividad de células T, pero cada forma tiene un fenotipo diferente debido a la implicación diferencial de subconjuntos de células T citotóxicas (CD8+) o auxiliares (CD4+). Las células T CD8+ del donante se activan cuando su receptor de células T (TCR) se une a péptidos del receptor presentado en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los modelos *in vivo* de ratón adecuados se revisan en Schroeder M.A. & DiPersio J.F., Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations; Dis Model Mech. 2011 May;4(3):318-33.

Los modelos de tumor adecuados son el modelo de cáncer de piel (melanoma B16) o modelo de cáncer de fibrosarcoma (línea celular MCA-102 o MCA-207). Después de la inyección de líneas celulares de cáncer o células tumorales primarias, los ratones C57BL/6 o BALB/c desarrollan cánceres. Las células T y CD, preferentemente CDP, se incuban con un lisado celular tumoral *in vitro*. A continuación, las células T solas o en combinación con CD se inyectan en el ratón que alberga la célula tumoral. La eficacia de la inmunización con CDP se mide mediante cuantificación de desarrollo de metástasis y el desarrollo y actividad de células T citotóxicas. Otros modelos tumorales en ratón son, por ejemplo, el modelo de cáncer de pulmón metastático inducido por B16-F10 (Liu et al., JCI, 2008) o el modelo de linfoma de células T E.G7 (Lou et al., J Immunol, 2007). En ambos modelos, se inyectaron CDP en los ratones que albergaban el tumor (las células tumorales se habían inyectado antes), se inyectaron antes de que se aplicaran las células tumorales o ambas en paralelo. Después de varios días/semanas se podía medir el tamaño del tumor.

Los modelos de trasplante adecuados son trasplantes de órganos alogénicos en el ratón, por ejemplo, el trasplante de piel y cardíaco, el trasplante de médula ósea, con co-trasplantes de CD, preferentemente CDP. Por ejemplo, los ratones receptores B10.BR o BA.B10 se radiaron con 2 dosis de 5,5 Gy separadas por 3 horas el día -2. El día 0, los ratones receptores se trasplantaron con combinaciones de 3 a 5 x 10³ de HSC clasificados con FACS, 5 x 10⁴ de pre-CDP donantes clasificados por FACS, y 3 x 10⁵ o 1 x 10⁶ de células T purificadas por MACS de donantes B6 CD45.1. Los ratones se pesaron dos veces a la semana y se examinaron diariamente en cuanto a signos de GvHD como se ha descrito previamente. Se practicó la eutanasia a los animales moribundos que perdían más de un 25 % del peso corporal inicial, y los ratones que sobrevivieron hasta el final del experimento, y se procesaron los tejidos para el análisis histopatológico de los sitios tróficos tumorales, incluyendo el hígado, intestino delgado e intestino grueso. Se

- llevaron a cabo análisis citométricos de flujo del quimerismo en leucocitos sanguíneos los días 40 (+1), 60 (+2), y 90 (+5) después del trasplante (Lu Y et al., Blood. 2012 Jan 26;119(4):1075-85). Además, se trasplantaron los corazones en BALB/c como injertos heterotópicos completamente vascularizaron en C57BL/6 como se ha descrito. Los injertos cardíacos BALB/c se trasplantaron suturando la aorta del donante y la arteria pulmonar del donante terminolateralmente a la aorta abdominal inferior y la vena cava inferior del receptor C57BL/6, respectivamente. Los ratones receptores recibieron inyecciones intravenosas en 0,5 ml de PBS en distintos momentos. Para la tolerancia, los ratones se trataron con DST (1×10^7 esplenocitos del donante por vía intravenosa) los días -7, -4, 0 y +4 (momentos respecto al trasplante). Un grupo recibía 100 mg de mAb de CD40L 30 d después de tolerización y los ratones con rechazo a los 37-40 d. La función de injerto se controlaba día sí día no por palpación abdominal. Se estudió la tolerización de los ratones 1, 5 y 10 semanas después del trasplante. Los ratones que sobrevivían al injerto 10 semanas o más se consideraban 'tolerizados' (llamados 'tolerizados de 10 semanas' aquí). Los ratones de control sin tratar recibieron IgG de hámster en PBS y el rechazo, definido como el cese completo de latido palpable y se confirmaron por visualización directa en la laparotomía, se producía 1 semana después del trasplante (Qian S et al, Hepatology. 1994 19:916-924).
- En una realización preferida adicional, las células primarias o líneas celulares, que expresan p75NTR y/o al menos uno de TLR4, TLR7 y/o TLR9 se preincubaron con la sustancia de ensayo o antagonistas y/o agonistas de p75NTR en presencia o ausencia de agonistas naturales de p75NTR o precursores de los mismos. Los agonistas de p75NTR naturales son por ejemplo el factor de crecimiento de nervios (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4) y neurotrofina-5 (NT-5) o una combinación de los mismos. Los precursores de agonistas p75NTR naturales son por ejemplo pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT-3, pro-NT-4, pro-NT-5 o una combinación de los mismos.
- La sustancia de ensayo se puede administrar a los modelos animales mediante cualquier vía adecuada. Una administración típica se lleva a cabo por vía oral o intravenosa.
- Las células primarias o líneas celulares, que expresan p75NTR y/o al menos uno de TLR4, TLR7 y/o TLR9, se inyectan normalmente en la corriente sanguínea o en órganos o tejidos deseados específicamente de los modelos animales.
- Con el fin de determinar el efecto antagonista o agonista de una sustancia *in vivo*, se puede detectar la activación de células T determinando la expresión de citocinas de células T tales como, por ejemplo, quimiocinas, interferones, interleucinas, linfocinas y factor de necrosis tumoral; proliferación de células T; inducción de clones de células T específicas de antígeno y/o inducción de células T reguladoras en muestras obtenidas de animales tratados. Las muestras son preferentemente muestras de sangre o muestras de tejido.
- Preferentemente, dicha muestra y/o muestra de control ya se había obtenido del animal tratado y/o el animal de control antes de la determinación del efecto de la sustancia de ensayo en el modelo animal.
- La determinación *in vivo* del efecto antagonista o agonista de una sustancia de ensayo se lleva a cabo preferentemente en presencia de animales de control. Más preferentemente, se utilizan animales de la misma especie y/o cepa, como animales de control. Más preferentemente, se utilizan animales que comprenden al menos células dendríticas plasmacitoides, pero en las que el p75NTR no se expresa o se expresa a un nivel menor, como animales de control. Esto permite que el efecto *in vivo* de la sustancia de ensayo sobre la señalización de p75NTR se puede atribuir directamente o sin ambigüedades a la diana p75NTR. Además, se pueden reconocerlos posibles efectos secundarios de la sustancia de ensayo sobre las dianas. En consecuencia, los agentes de ensayo que muestran un efecto agonista o antagonista sobre la señalización de p75NTR con alta especificidad y sin efectos secundarios indeseables se pueden cribar y seleccionar para un desarrollo posterior.
- En una realización, se utilizan animales que comprenden al menos células dendríticas plasmacitoides, pero en las que el p75NTR está inactivado, como animales de control.
- Al igual, el nivel de p75NTR se puede reducir de otra manera. Adicionalmente es adecuado de acuerdo con la invención el uso de animales, que comprenden al menos células dendríticas plasmacitoides, pero en las que la expresión de p75NTR está reducida o inhibida, como animales de control.
- Con el fin de proporcionar animales de control apropiados, en una realización de la invención, se administran células dendríticas plasmacitoides a los animales de control, las cuales no expresan naturalmente p75NTR, o en las que el gen p75NTR está inactivado o en las que la expresión del gen p75NTR está reducida o inhibida. En otra realización, el gen p75NTR puede estar inactivado o la expresión del gen p75NTR está reducida o inhibida no solo en las células dendríticas plasmacitoides sino también en las células endógenas de los animales de control.
- La reducción o inhibición de p75NTR se pueden conseguir, por ejemplo, utilizando ARNhp, ARNip, nucleótidos antisentido y similares.
- Un ARN pequeño ahorquillado o un ARN corto ahorquillado (ARNhp) es una secuencia de ARN que hace una vuelta en horquilla estrecha que se puede utilizar para silenciar la expresión del gen diana mediante un ARN de interferencia

(ARNi). La expresión del ARNhp en las células se consigue normalmente suministrando plásmidos o mediante vectores víricos o bacterianos. El ARN pequeño de interferencia (ARNip), a veces conocido como ARN corto de interferencia o ARN silenciante, es una clase de moléculas de ARN de doble cadena de aproximadamente 20-25 pares de bases de longitud. El ARNip interfiere en la expresión de genes específicos con secuencias de nucleótidos complementarias. El ARNip funciona produciendo la rotura del ARNm después de la transcripción dando como resultado la no traducción.

En una realización preferida la invención proporciona un método para la determinación *ex vivo* del efecto antagonista o agonista de una sustancia de ensayo en las muestras que se obtenían de los modelos animales mencionados anteriormente y los animales de control después de que los modelos animales mencionados anteriormente hayan recibido las células dendríticas plasmacitoides y la sustancia de ensayo.

La invención se refiere adicionalmente a antagonistas y agonistas de la señalización de p75NTR que se han identificado con los métodos de ensayo y/o cribado de la presente invención. Los agonistas y antagonistas – como se identifican con los métodos desvelados en el presente documento pueden incluir proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, anticuerpos, o cualquier otra molécula; por ejemplo, pueden incluir moléculas pequeñas y compuestos orgánicos que se unen al p75NTR mediante un mecanismo de tipo competitivo o no competitivo. Se preferían antagonistas y agonistas de p75NTR de molécula pequeña.

En una realización adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un antagonista o agonista del p75NTR y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el presente aspecto de la invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido con respecto a una de las enfermedades. La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz está bien en la experiencia de los expertos en la técnica y se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivos celulares, por ejemplo, de células neoplásicas, o en modelos animales, habitualmente ratones, ratas, conejos, perros, monos o cerdos. Un modelo animal también se puede utilizar para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Esta información se utiliza entonces comúnmente para determinar las dosis útiles y las vías de administración en seres humanos.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de ingrediente activo, por ejemplo, un anticuerpo contra p75NTR, o un agonista, antagonista o inhibidor de p75NTR, que mejora síntomas particulares o condiciones de la enfermedad. Por ejemplo, la cantidad que se va a administrar puede ser eficaz para inhibir la actividad del p75NTR. La eficacia terapéutica y toxicidad puede igualmente determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o con animales de experimentación, tal como calculando las estadísticas de la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) o la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis de efectos tóxicos respecto a terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación DL50/DE50. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que presentan grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se utilizan en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación contenida en dichas composiciones está preferentemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente, y la vía de administración.

Una dosificación exacta la determinará normalmente el médico encargado a la luz de factores relacionados con el sujeto que necesita el tratamiento, ajustándose la dosificación y administración para proporcionar un nivel suficiente del resto activo o para mantener un efecto deseado. Los factores a tener en cuenta incluyen la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, peso, y género del sujeto, la dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinaciones farmacológicas, reacciones de sensibilidad, y tolerancia/respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 33 o 4 días, cada semana, o incluso cada dos semanas, dependiendo de la semivida y velocidad de aclaramiento de la formulación en particular.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de enfermedades o afecciones patológicas que se relacionan con la señalización de p75NTR, preferentemente de enfermedades inmunitarias, que comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agonista de p75NTR o un antagonista de p75NTR o de una composición farmacéutica que comprende los mismos a un sujeto que tiene necesidad de los mismos.

De la misma manera, la invención proporciona el uso de un agonista de p75NTR o un antagonista de p75NTR o de una composición farmacéutica que comprende los mismos en dichos métodos de tratamiento. Además, los agonistas de p75NTR y antagonistas de p75NTR o las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos se proporcionan para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones patológicas que están relacionadas con la señalización de p75NTR.

En una realización preferida adicional, la enfermedad o afección patológica que se relaciona con la señalización de

p75NTR, se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedades neurodegenerativas centrales o periféricas, demencia senil, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Down, enfermedades priónicas, amnesia, esquizofrenia, depresión, trastorno bipolar, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, afecciones cardiovasculares, daño cardíaco post-isquémico, cardiomiopatías, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, isquemia cardíaca, infarto cerebral, neuropatías periféricas, daño del nervio óptico y/o de la retina, degeneración retiniana pigmentaria, glaucoma, isquemia retiniana, degeneración macular, traumatismos de la médula espinal, traumatismos craneales, aterosclerosis, estenosis, trastornos de cicatrización de heridas, alopecia, cualquier tipo de cáncer, cualquier tipo de tumores, cualquier tipo de metástasis, cualquier tipo de leucemia, trastornos respiratorios, inflamación pulmonar, alergia, anafilaxia, asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dolor cutáneo, dolor somático, dolor visceral, dolor neurológico, dolor neuropático crónico, dolor inflamatorio, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide (poliartritis, oligoartritis), espondilitis anquilosante, colagenosis, lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de SHARP, síndrome de Sjögren, escleroderma, polimiositis, dermatomiositis, esclerosis sistémica progresiva, espondiloartritis (Enfermedad de Bechterew, artritis reactiva, artritis enteropática, artritis psoriásica, espondiloartritis no diferenciada), fiebre reumática, síndrome de Aicardi-Goutieres, vasculitis, enfermedad de granulomatosis de Wegener, nefritis, ictus, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, enfermedad de Whipple, esclerodema, enfermedad de Stiffs, displasia broncopulmonar (BPD), bronquiolitis, bronquiolitis asociada a RSV, diabetes mellitus, síndrome de fibromialgia, enfermedad celíaca, enfermedad de Hashimoto, hipotiroidismo, hipertiroidismo, enfermedad de Addison, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), trombocitopenia autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, síndrome del Lofgren, enfermedad de Behcet, síndrome nefrótico, uveítis, artritis psoriásica, psoriasis (psoriasis en placa, psoriasis pustular), fracturas óseas, enfermedades óseas, osteoporosis y todas las enfermedades infecciosas bacterianas, fúngicas, víricas, así como las infecciones con parásitos eucariotas.

En una realización adicional, la presente invención proporciona una combinación de al menos un compuesto seleccionado de entre un agonista de la señalización de p75NTR o un antagonista de la señalización de p75NTR y un activador de células dendríticas, preferentemente de células dendríticas plasmacitoides.

La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende dicha combinación de al menos un producto seleccionado de entre un agonista de la señalización de p75NTR o un antagonista de la señalización de p75NTR y un activador de una célula dendrítica, preferentemente una célula dendrítica plasmacitoide y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica que comprende dicha combinación preferentemente es una composición vacunal.

Dicho activado de la célula dendrítica, preferentemente la célula dendrítica plasmacitoide es preferentemente un agonista del receptor TLR, más preferentemente un agonista del TLR9.

La combinación de al menos un compuesto seleccionado de entre un agonista de la señalización de p75NTR o un antagonista de la señalización de p75NTR y un activador de una célula dendrítica, preferentemente una célula dendrítica plasmacitoide, y la composición farmacéutica que comprende dicha combinación son especialmente adecuadas para su utilización en inmunoterapia, tal como el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas. Más preferentemente, dicha combinación o composición farmacéutica que comprende dicha combinación es adecuada para su uso en el tratamiento de enfermedades alérgicas o en la desensibilización alérgica. Incluso preferentemente, dicha combinación o composición farmacéutica que comprende dicha combinación es adecuada para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias crónicas, GvHD o después del trasplante para evitar el fallo del injerto.

En una realización preferida adicionalmente los antagonistas o agonistas de la señalización de p75NTR se pueden utilizar para inducir las condiciones que comprenden, pero no se limitan al efecto del injerto frente al efecto leucemia (GvL). El GvL o injerto frente a efecto tumoral (GvT) es el aspecto beneficioso de la enfermedad del injerto contra el huésped (GvL). La GvL principalmente es beneficiosa en las enfermedades de progresión lenta, por ejemplo, leucemia crónica, linfoma de grado bajo, y algunos casos de mieloma múltiple.

En una realización preferida adicional, la invención proporciona un método de control de la eficacia de la terapia de enfermedades o afecciones patológicas que se relacionan con la señalización de p75NTR en un sujeto que comprende las siguientes etapas:

- Medición de la activación de las células T tal como la expresión de citocinas de células T, proliferación de células T, inducción de clones de células T específicas del antígeno, inducción de células T citotóxicas y/o inducción de células T reguladoras en muestras tomadas en dos o más ocasiones del sujeto; y
- Comparación del nivel de expresión de citocinas de células T, células T proliferadas, clones de células T específicos del antígeno, inducción de células T citotóxicas y/o células T reguladoras en una muestra tomada del sujeto con el nivel presente en una muestra tomada del sujeto antes de comenzar la terapia, y/o una muestra tomada del sujeto en un estadio anterior de una terapia.

- Las muestras se pueden tomar a intervalos sobre el resto de la vida, una parte de la misma, de un sujeto, es decir, las muestras biológicas para controlar la eficacia de una terapia se pueden tomar en dos o más ocasiones. Adecuadamente, el tiempo que pasa entre dos tomas de muestras de un sujeto sometido a diagnóstico o control, será de 3 días, 5 días, una semana, dos semanas, un mes, 2 meses, 3 meses, 6 o 12 meses. Las muestras pueden tomarse
- 5 antes y/o durante y/o después de una terapia de enfermedad proliferativa, tal como una quimioterapia. En una realización preferida, el método de control comprende la detección de un cambio de la cantidad de citocinas de células T, células T proliferadas, clones de células T específicos de antígeno, inducción de células T citotóxicas y/o células T reguladoras en muestras tomadas en dos o más ocasiones.
- 10 El p75NTR en las CD, más preferentemente en las CDP parece que funcionan como un interruptor maestro en la regulación de respuestas inmunitarias. La modulación de respuestas inmunitarias en la función principal de los adyuvantes vacunales. Por lo tanto, los agonistas y antagonistas del p75NTR proporcionan un medio de nuevos adyuvantes.
- 15 La activación de p75NTR en las CD, más preferentemente en las CDP inducen fuertemente respuestas inmunitarias Th2. Por lo tanto, los agonistas pueden reforzar las respuestas inmunitarias en vacunas dependientes de Th2. La respuesta inmunitaria dirigida es similar a las sales de aluminio, pero funcionan sin inducir inflamación local. Los agonistas de p75NTR se pueden utilizar para sustituir los adyuvantes vacunales actuales o se podrían utilizar en combinación para reforzar una respuesta a la vacunación.
- 20 En una realización adicional, la presente invención se refiere, por lo tanto, a una composición vacunal que comprende un modulador de la señalización de p75NTR, es decir, un antagonista o agonista de la señalización de p75NTR. Preferentemente, la señalización de p75NTR se modula en las células dendríticas que expresan p75NTR, más preferentemente en células dendríticas plasmacitoides que expresan p75NTR.
- 25 En una realización preferida, la invención proporciona el uso de una composición vacunal que comprende un agonista de p75NTR para la modulación de las respuestas inmunitarias que comprende, pero no se limita a la estimulación de la respuesta inmunitaria de Th2, la supresión de respuestas inmunitarias de Th1, la supresión de respuestas inmunitarias de Th17, la supresión de la tolerancia a las p75NTR células T reguladoras p75NTR y similares.
- 30 Los agonistas de p75NTR preferidos para su uso en la composición vacunal se seleccionan de entre el grupo que comprende NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 y similares.
- 35 Los agonistas de p75NTR que son adecuados para su uso en la composición vacunal de la invención se seleccionan de entre los anticuerpos activantes, tales como un anticuerpo MC192 anti-p75NTR (Kimpinski et al., Neurosci 1999, 93:253-263), péptidos activantes y pequeñas moléculas activantes (por ejemplo, LM11A y compuestos derivados, que comprende, pero no se limitan a LM11A-24 o LM11A- 31, LM11A- 36) o están codificados por un ácido nucleico.
- 40 En una realización preferida adicional, la invención proporciona el uso de una composición vacunal que comprende un antagonista de p75NTR para la modulación de las respuestas inmunitarias que comprende, pero no se limita a la supresión de las respuestas inmunitarias Th2, la estimulación de las respuestas inmunitarias Th1, la estimulación de las respuestas inmunitarias Th17, la supresión de la tolerancia inducida por las células T reguladoras y similares.
- 45 Los antagonistas de p75NTR preferidos para su uso en la composición vacunal de la invención se seleccionan de entre el grupo que comprende pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT-3, pro-NT-4, pro-NT-5 y similares.
- 50 Los antagonistas de p75NTR preferidos adicionalmente, que son adecuados para su uso en la composición vacunal de la invención se seleccionan de entre los anticuerpos bloqueantes (clones de anticuerpo monoclonal anti- p75NTR humano: ME20.4, MLR2, HB-8737, NGFR5 y derivados p75NTR y versiones humanizadas de los mismos; y AB1554; anticuerpos que evitan la unión de las neurotrofinas al p75NTR: Tanezumab una versión humanizada del mAb 911, PG110, REGN475 y Fulranumab), el péptido de bloqueo tat-PEP5; e inhibidores de molécula pequeña (derivados de 2-oxo-alkil-l-piperazina-2-ona; y moléculas pequeñas que evitan el unión de neurotrofinas al p75NTR: PD 90780, ALE-054, Ro 08-2750, Y1036).
- 55 Los péptidos bloqueantes preferidos inhiben específicamente la unión de TRAF6 al dominio intracelular de p75NTR (los péptidos que bloquean la interacción de p75NTR con TRAF6 incluyen péptidos de unión al motivo proteico EGEKLSHSDSGISVDS (SEQ ID No. 1) desde el dominio intracelular de p75NTR, los péptidos TRAF6 señuelo que comprenden el péptido RPTIPRNP (SEQ ID NO. 2).
- 60

La composición vacunal de la invención puede comprender adicionalmente moduladores de la señalización de p75NTR en combinación con agentes inmunoestimulantes, que se seleccionan, por ejemplo, de entre monofosforil lípido A (MPL) (tal como CPG, etc.), ARN de cadena doble (ARNds), patrones moleculares asociados con patógenos alternativo (PAMP, tal como la endotoxina termolábil (TL) de *E. coli*; flagelina, saponinas (Quils, QS-21), potenciadores 5 inmunitarios de molécula pequeña (SMIP, por ejemplo, resiquimod [R848]), citocinas, quimiocinas y antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*.

La composición vacunal de la invención puede comprender adicionalmente moduladores de la señalización de p75NTR en combinación con compuestos de aluminio insolubles, fosfato cálcico, liposomas, micropartículas (por 10 ejemplo, PLGA), emulsiones (por ejemplo, MF59, Montanidas), partículas tipo virus y vectores víricos.

La composición vacunal de la presente invención puede comprender células dendríticas aisladas, preferentemente células dendríticas plasmacitoides, más preferentemente células dendríticas aisladas que expresan p75NTR o CDP. En una realización preferida, las células dendríticas aisladas se incuban *ex vivo* con al menos un modulador de la 15 señal de p75NTR antes de la administración de la composición vacunal al sujeto.

En una realización preferida de la invención, se utiliza al menos un agonista de p75NTR para sensibilizar dichas células dendríticas aisladas para modular las respuestas inmunitarias que comprende, pero no se limitan a la estimulación de la respuesta inmunitaria de Th2, supresión de la respuesta inmunitaria de Th1, supresión de la respuesta inmunitaria 20 de Th17 y supresión de tolerancia inducida por células T reguladoras.

En una realización preferida más de la invención, se utiliza al menos un antagonista de p75NTR para sensibilizar dichas células dendríticas aisladas para modular respuestas inmunitarias que comprenden, pero no se limitan a 25 supresión de la respuesta inmunitaria Th2, estimulación de la respuesta inmunitaria Th1, estimulación de la respuesta inmunitaria Th17 y supresión de tolerancia inducida por células T reguladoras.

Cuando se codifica el agonista o el antagonista por un ácido nucleico como un ARNhp o ARNip, dicho ácido nucleico se transfectar preferentemente en las células dendríticas dando lugar a la sobreexpresión del agonista o antagonista 30 en la célula dendrítica.

En una realización preferida adicional, las composiciones vacunales comprenden un agonista de la señalización de p75NTR seleccionado de entre el grupo que comprende NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 o un antagonista de la 35 señalización de p75NTR seleccionado de entre el grupo que comprende pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT-3, pro-NT-4, pro-NT-5.

Ejemplos de antagonistas de la señalización de p75NTR, que son adecuados para su uso en vacunas de la invención y/o para su uso en terapia, preferentemente inmunoterapia de acuerdo con la invención se selecciona de entre los 40 grupos que comprenden:

- Anticuerpos monoclonales anti- p75NTR humano, seleccionados de entre los clones ME20.4, MLR2, HB-8737, y NGFR5, derivados y versiones humanizadas de los anticuerpos mencionados anteriormente;
- El anticuerpo monoclonal anti- p75NTR murino AB1554;
- El péptido tat-PEP5, péptidos que bloquean la interacción de p75NTR con TRAF6 seleccionados de entre 45 péptidos que se unen al motivo proteico EGEKLHSDSGISVDS (SEQ ID NO. 1) del dominio intracelular de p75NTR, péptidos señuelo que comprenden el péptido RPTIPRNP (SEQ ID NO. 2);
- Moléculas pequeñas seleccionadas de los derivados 2-oxo-alkil-piperacina-2-ona, derivados de la naftalimida
- ARNip, ARNhp, morfolinós, que bloquean la expresión de p75NTR o la señalización corriente abajo;
- Antagonistas de neurotrofinas que evitan la unión de NGF o BDNF al p75NTR, seleccionados de entre:

- Anticuerpos: derivados y versiones humanizados de Tanezumab (una versión humanizada del mAb 911, PG110, REGN475 y fulranumab);
- Moléculas pequeñas tales como PD 90780, ALE-054, Ro 08-2750, y Y1036.

Ejemplos de activadores de una célula dendrítica preferentemente una célula dendrítica plasmacitoide que sean 55 adecuados para su uso en las vacunas de la invención y/o para su uso en terapia, preferentemente inmunoterapia de acuerdo con la invención se selecciona de entre el grupo que comprende:

- Agonistas del TLR9, tal como:

- ADN bacteriano;
- CPG-ODN Clase A, tales como el ODN 1585, ODN 2216, ODN 2336;
- CPG-ODN Clase B, tales como ODN BW006, ODN D-SL01 ODN 1668; ODN 1826, ODN 2006, ODN 2007; y
- CPG-ODN Clase C, tal como ODN D-SL03, ODN 2395, ODN M362.

Ejemplos de agonistas de la señalización de p75NTR que son adecuados para su uso en las vacunas de la invención 65 y/o para su uso en terapia, preferentemente en inmunoterapia de acuerdo con la invención se seleccionan de entre el grupo que comprende:

- Neurotrofinas, seleccionadas de entre NGF, NGF-Delta 9/13 mutante, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5, pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT-3, pro-NT-4, pro-NT-5;
- Moléculas pequeñas seleccionadas de LM11A-24 o LM11 A-31;
- Ácidos nucleicos que codifican p75NTR, p75NTR activo constitutivamente, o fragmentos de los mismos.

5

La invención se describe adicionalmente a continuación en los siguientes ejemplos de trabajo

Ejemplos de la invención

10 Ejemplo 1: Muestras de sangre periférica humana

Las muestras de sangre utilizadas para la purificación celular se obtuvieron de dos fuentes diferentes:

- 15 a) muestras recientes de la capa leucocitaria de no más de 8 horas, que servían como la fuente de las células dendríticas plasmacitoides (CDP) que se utilizando en los experimentos con oligodesoxinucleótidos (ODN) y estimulación de anti-FcεR1α.
- 20 b) células T CD4+ auxiliares y CDP utilizadas en los ensayos de proliferación de celas T CD4+ se purificaron de la sangre periférica (80 ml) obtenida de especies donantes que se sabe que tienen alergia a ciertos alérgenos. La sangre periférica se extrajo en tubos que contenían Li-Heparina como anticoagulante (S-Monovette Li-Heparin 7,5 ml, Sarsstedt).

Ejemplo 2: Separación de linfocitos de la sangre periférica por centrifugación en gradiente de densidad

25 La sangre periférica se transfirió a un tubo de 50 ml y se centrifugó (470 g durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). La capa de leucocitos intermedia, entre los eritrocitos sedimentados y la fase de trombocitos superior, se extrajo junto con pocos mililitros de eritrocitos. En un tubo nuevo de 50 ml se diluyeron los leucocitos con 3 volúmenes de IX PBS que contenía 2 mM de EDTA y un 0,5 % de BSA (PBS E/B). La mezcla cubrió cuidadosamente en la parte superior con solución de separación ficoll (solución de separación Percoll, densidad 1,074 g/ml, Biochrom AG) y se centrifugó (1000 g sin freno durante 20 minutos a TA). Los eritrocitos y granulocitos sedimentados en el fondo del tubo, las células mononucleares (linfocitos) y las plaquetas se recolectaron en un tubo nuevo a partir de la interfaz entre la capa de plasma en la fase superior y los eritrocitos/granulocitos sedimentados. Las células recolectadas se lavaron una vez con 50 ml de PBS E/B y se centrifugaron (200 g durante 15 minutos a TA). Se eliminó completamente el sobrenadante. Para agotar las plaquetas, a continuación del primer lavado el aglomerado de celas mononucleares se lavó dos veces añadiendo 50 ml de PBS E/B y se centrifugó (200 g durante 15 minutos a TA). Al centrifugar a 200 g, la mayoría de las plaquetas se mantenían en el sobrenadante. El sobrenadante se desechó. El aglomerado de linfocitos se resuspendió en 20 ml de PBS E/B. Para retirar los aglomerados y coágulos sanguíneos, que pueden atascar las columnas de separación celular MACS durante las purificaciones celulares, las células se pasaron a través de una malla de nylon que tenía 40 um de tamaño de poro (Cell Strainer, BD Biosciences).

40 Ejemplo 3: Purificaciones celulares

Purificación de células T CD4+ auxiliares

45 Se contaron las células mononucleares separadas de la sangre periférica. Se purificaron las células T CD4+ auxiliares de entre las células mononucleares de la sangre periférica por selección negativa utilizando el kit II de aislamiento de células T CD4+ (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante, con ligeras modificaciones. En resumen, el aglomerado celular se resuspendió en 50 ul de PBS E/B. Después, se añadieron 12 ul de coctel de anticuerpos marcado con biotina por cada 10⁷ células totales y la suspensión celular se incubó a 4 °C durante 15 minutos. Se añadieron 50 ul de PBS E/B seguido por la adición de 25 ul de microperlas anti-biotina por cada 10⁷ células totales. 50 Las células se incubaron a 4 °C durante otros 20 minutos, seguido por lavado con 10 ml de PBS E/B y centrifugación (470 g durante 6 minutos). El sobrenadante se extrajo completamente y el aglomerado se resuspendió en 500 ul de PBS E/B. La suspensión se aplicó a una columna de separación MACS MS equilibrada y la fracción enriquecida con células T CD4+ auxiliares se obtuvo del flujo directo. La pureza de las células T CD4+ auxiliares estaba por encima del 95 % como se evaluó por análisis citométrico de flujo después de co-tinción con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD3-PE humano (BD Biosciences) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4-FITC humano (BD Biosciences). 55 Cuando se utilizaban más de 10⁷ células, los volúmenes de reactivos y tampón se escalaban en consecuencia.

Purificación de células dendríticas plasmacitoides (CDP)/BDCA4+

60 Al igual que en el aislamiento de las células T CD4+ auxiliares a partir de las células de la sangre periférica, se determinó el número total de células antes de la purificación de CDP. Las CDP se purificaron utilizando el kit de microperlas CD304 (BDCA-4/Neurofilina-1) (Miltenyi Biotec) por selección positiva, siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. En resumen, se centrifugó la suspensión celular (450 g durante 6 minutos) y se resuspendió el aglomerado en 300 ul de PBS E/B. Entonces se añadieron 100 ul de reactivo de bloqueo FcR y microperlas CD304 (BDCA-4/Neurofilina-1) por 10⁸ células totales. La suspensión células se incubó a 4 °C durante 20 minutos. Las células se lavaron con 10 ml de PBS E/B y se centrifugaron (470 g durante 6 minutos). El aglomerado

65

células se resuspendió en 500 ul de PBS E/B y se cargó en una columna de separación celular MACS LS aclarada (Miltenyi Biotech). Las células marcadas se unían a la columna de separación celular. La columna de separación se lavó tres veces con 1 ml de PBS E/B. Para aumentar la pureza de las CDP, la fracción eluida se enriqueció sobre una segunda columna de separación celular MACS MS. Se repitió un procedimiento de separación celular magnética como se ha descrito para la primera columna LS para la segunda columna MS excepto que el lavado de la columna MS se llevó a cabo con 500 ul de PBS E/B. Las CDP purificadas se contaron y se evaluó la pureza por análisis citométrico de flujo tras la tinción de las células con anticuerpo monoclonal de ratón anti-BDCA2-PE humano (Miltenyi Biotech) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD271-APC humano (Miltenyi Biotech). El volumen de los reactivos y los tampones mencionados son para hasta 10^8 de células totales. Cuando se utilizaban un número de células totales mayor que el determinado el volumen de reactivo y tampones también se escalaron en consecuencia.

Ejemplo 3: Estimulaciones de CDP *in vitro*

IFN-alfa producido por CDP estimuladas con oligodesoxinucleótidos (ODN)

Las CDP aisladas de la sangre periférica se pusieron en medio RPMI 1640 (PAA) que contenía penicilina G (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml), L-glutamina (2 mM), un 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FCS) e interleucina-3 (IL-3, R&D Systems) a 10 ng/ml. Se sembraron 5×10^4 células por pocillo en 200 ul de medio en una placa de 96 pocillo con fondo en forma de U y se incubaron con un 5 % de CO₂ y 37 °C. Para la inducción de IFN α , se añadieron 0,33 ug/pocillo de ODN 2216 estimulante y ODN 2243 de control (Alexis Biochemicals), a los pocillos designados. Se empleó el péptido de bloqueo de p75NTR TAT-Pep5 (Calbiochem) a 100 nM para los pocillos designados. Se añadió NGF (R&D Systems) a 200 ng/ml a los pocillos localizados. Todos los componentes se añadieron en el orden de sucesión que se menciona. Después de 12-14 horas de estimulación la placa se centrifugó (270 g durante 5 minutos). El sobrenadante se recolectó y se analizó en cuanto a la cuantificación de IFN α por ELISA (Bender MedSystems).

ELISA de IFN α

Se llevó a cabo el ELISA de IFN α de acuerdo con las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. En breve, se añadieron 100 ul de 10 ug/ml de anticuerpo de revestimiento en PBS a cada uno de los pocillos situados en una placa EIA/RIA stripwell plana de 96 pocillos (Corning Incorporated). La placa se cubrió con Parafilm M (Pechinery Plastic Packaging Company) y se incubó durante una noche a 4 °C. Los pocillos se aspiraron y lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS que contenía un 0,05 % de Tween 20). La placa se bloqueó añadiendo 250 ul de tampón de ensayo (5 g BSA añadido a 1 litro de tampón de lavado) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Antes de añadir las muestras, los pocillos se vaciaron y la placa se lavó dos veces con 300 ul de tampón de lavado. Se añadieron 100 ul de tampón de ensayo por duplicado a pocillos en blanco y los pocillos situados como referencia, dejando los primeros pocillos (500 pg/ml) vacíos. Se añadieron 90 ul de tampón de ensayo por duplicado a todos los pocillos designados para los ejemplos. Se diluyeron 50 ng/ml de IFN-alfa de referencia en 500 ul de tampón de ensayo para obtener una concentración final de 500 pg/ml. Las diluciones de las líneas de IFN-alfa variaban de 500 a 8 pg/ml que servían como referencia. Se añadieron 10 ul de sobrenadante y se mezcló en los pocillos localizados. Se diluyó 1:1000 de anticuerpo de detección conjugado con peroxidasa de rábano rústico (HRP) con tampón de ensayo y se añadieron 50 ul a todos los pocillos, incluidos los pocillos de blanco. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Los contenidos de los pocillos se retiraron y se lavaron los pocillos veces con 300 ml de tampón de lavado por pocillo. Se añadieron 100 ul de 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) como solución de sustrato (Sigma) a todos los pocillos y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos. Cuando se desarrolló un color azul oscuro en el pocillo con las referencias con más alta concentración proteica, se paró la reacción enzima-sustrato añadiendo 100 ul de solución de ácido sulfúrico 4 N en cada pocillo. Se leyó la absorbancia de toda la placa en un espectrofotómetro (TECAN, Infinite 200) a 450 nm como longitud de onda primaria y 630 como longitud de onda de referencia.

IL-6 producida por CDP activadas antiF α c ϵ RI α

Las CDP aisladas de la sangre periférica se pusieron en medio RPMI 1640 (PAA) con penicilina G (100 U/ml), estreptomicina (100 ng/ml), L-glutamina (2 mM), un 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor e IL-3 (R&D Systems) a 10 ng/ml. Se sembraron 2×10^5 células por pocillo en 200 ul de medio en placas de 96 pocillos con fondo en forma de U y se incubaron con un 5 % de CO₂ y 37 °C. Para la generación de IL-6, se añadió anticuerpo de ratón anti-F α c ϵ RI-alfa-FITC humano (eBioscience) a 250 ng/ml a los pocillos designados. El péptido de bloqueo de p75NTR TAT-Pep5 (Calbiochem) se empleó a 100 nM en los pocillos designados. Se añadió NGF (R&D Systems) a una concentración de 25 ng/ml a los pocillos especificados. Todos los componentes se añadieron siguiendo la secuencia mencionada. Después de una estimulación de 15 horas, la placa se centrifugó 270 g durante 5 minutos). El sobrenadante se analizó en cuanto a IL-6 por ELISA (Bender MedSystems).

ELISA de IL-6

Se llevó a cabo el ELISA de la IL-6 siguiendo las especificaciones de fabricante con pocas modificaciones. En resumen, se añadieron 100 ul de anticuerpo de revestimiento a 2,5 ug/ml en PBS a cada pocillo colocado en una placa EIA/RIA stripwell de 96 pocillos (Corning Incorporated). La placa se cubrió con Parafilm M (Pechinery Plastic Packaging Company) y se incubó durante una noche a 4 °C. Se aspiraron los pocillos y se lavaron tres veces con 200 ul de tampón de lavado (PBS que contenía un 0,0005 % de Tween 20) por pocillo. La placa se bloqueó añadiendo 350 ul de tampón de ensayo (tampón de lavado que contenía un 0,005 % de BSA) a cada pocillo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 23 horas. Antes de añadir las muestras, los pocillos se vaciaron y la placa se lavó dos veces con 300 ul de tampón de lavado. Se añadieron 100 ul de tampón de ensayo por duplicado a los pocillos de blanco y los pocillos localizados para la referencia. Se añadieron 60 ul de tampón de ensayo por duplicado a todos los pocillos designados para las muestras. Se diluyeron IL-6 proteica de referencia a 2 ng/ml en 250 ul de tampón de ensayo para obtener una concentración final de 200 pg/ml. Diluciones en serie de IL-6 proteica que variaban de 100 a 1,6 pg/ml servían como referencia. Se añadieron 40 ul de sobrenadante y se mezclaron en los pocillos colocados para las muestras. Se diluyó un anticuerpo de detección conjugado con biotina 1:1000 con el tampón de ensayo y se añadieron 50 ul a todos los pocillos. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Los contenidos de los pocillos se retiraron y se lavaron 3 veces con 300 ul de tampón de lavado por pocillo. Se añadieron 100 ul de estreptavidina-HRP, diluido 1:5000 con tampón de ensayo a todos los pocillos y la placa se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Los pocillos se aspiraron y se lavaron 3 veces con 300 ul de tampón de lavado por pocillo. Se añadieron 100 ul de solución de sustrato TMB (Sigma) a todos los pocillos, incluyendo los pocillos en blanco y se incubó la placa en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción enzima-sustrato se paró añadiendo 100 ul de ácido sulfúrico 4 N, en cada pocillo antes de que los pocillos positivos no se pudieran registrar apropiadamente. Se leyó la absorbancia de la placa completa en un espectrofotómetro a 450 nm como longitud de onda primaria y 620 nm como longitud de onda de referencia.

Ejemplo 4: Ensayo de proliferación de células T mediada por antígenoMarcado de células T CD4+ auxiliares con succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE)

Las células T CD4+ auxiliares (véase anteriormente) se lavaron una vez con PBS. Se resuspendieron $3-8 \times 10^6$ células en 1 ml de PBS que contenía un 5 % de BSA. Se disolvió una alícuota de CFSE en polvo (Molecular Probes, Invitrogen Technologies) en 18 ul de DMSO para obtener una concentración final de 5 mM. Las células T CD4+ se tiñeron con una concentración final de CFSE de 1 uM incubando la suspensión celular más 1 uM de CFSE a 37 °C durante 8 minutos. Se añadió 1 ml de FCS precalentado a la suspensión y se lavaron las células con medio RPMI dos veces. Se determinó el número de células.

Cocultivo de CDP autólogas y células T CD4+ auxiliares marcadas con CFSE

Se ensayaron las respuestas de proliferación de células T CD4+ auxiliares mediada por antígeno utilizando células T CD4+ purificadas y marcadas con CFSE en cocultivo con células PDC/BDAC4⁺. Las células T y CDP se resuspendieron separadamente en medio RPMI-1640 suplementado con penicilina G (100 U/ml), estreptomina (100 mg/ml), L-glutamina (2 mM) y un 10 % de suero AB humano. La relación de CDP respecto a célula T en cocultivo se mantuvo en 1:6. Los antígenos se añadieron al cocultivo a 50 SBE U/ml. El NGF se añadió a la concentración de 5, 25 y 50 ng/ml. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos con fondo en U a 37 °C en un 5 % de CO₂. Después de 5 días de cocultivo, se analizó el sobrenadante en cuanto a citocinas Th1/Th2 utilizando un kit de citocinas Th1/Th2 humanas con matriz de perlas de citocinas BD (CBA) (BD Biosciences) y los porcentajes de proliferación células T CD4⁺ con bajo CFSE se analizaron por citometría de flujo.

Medición de citocinas por matriz de perlas con citocinas (CBA)

Se determinaron las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ y TNF α en el sobrenadante utilizando el kit CBA siguiendo las instrucciones del fabricante con modificación en el análisis de datos utilizando Excel de Microsoft. En resumen, una CBA comprende perlas que presentan series de intensidades de fluorescencia diferentes que se resuelve en un canal FL3 de un citómetro de flujo. Cada serie de perlas está recubierta de un anticuerpo monoclonal específico de una única citocina, y una mezcla de seis perlas pueden detectar seis citocinas diferentes en una única muestra. El anticuerpo de detección conjugado con PE tiñe las perlas proporcionalmente con la cantidad de citocina unida. Después de la calibración de intensidad y procedimientos de compensación de color, se analizaron las referencias y la muestra de ensayo (sobrenadante) en el citómetro de flujo LSRII FACS equipado con el software DIVA (BD Biosciences). La curva de referencia creada para cada citocina se utilizó para calcular la concentración de citocina. Los límites de detección más bajas de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF α e IFN γ eran 2,6 pg/ml, 2,6 pg/ml, 2,4 pg/ml, 2,8 pg/ml y 7,1 pg/ml, respectivamente.

Ejemplo 5: La neurotrofina NGF aumenta fuertemente el asma alérgica mediada por CDP en ratones

La NGF está presente en el pulmón y aumenta durante los procesos inflamatorios tales como asma alérgica. Para investigar el impacto de NGF sobre las CDP durante la respuesta inmunitaria mediada por alérgeno, se incubaron

CDP p75^{NTR+/+} con ovoalbúmina (OVA) en presencia o ausencia de NGF (100 ng/ml) antes de la instilación intratraqueal a los ratones p75^{NTR+/+}. En el BALF, el número de eosinófilos y linfocitos había aumentado significativamente cuando la captación de OVA por las CDP se llevaba a cabo en presencia de NGF en comparación con las CDP incubadas solo con OVA (Fig. 1a, b). Además, las CDP cargadas con OVA tratadas con NGF causaban el aumento de producción de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en el pulmón en comparación con CDP pulsadas con OVA en ausencia de NGF (Fig. 1c). Las secciones histológicas de pulmón de los ratones que recibieron CDP cargadas con OVA presentaban un aumento de producción de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en el pulmón en comparación con las CDP pulsadas con OVA en ausencia de NGF (Fig. 1c). Las secciones histológicas del pulmón de los ratones que recibieron CDP cargadas con OVA presentaban un aumento de la inflamación perivascular y aumento de la producción de mucus (Fig. 1d). El tratamiento de CDP con NGF durante el fenotipo inflamatorio potenciado por captación de OVA en el pulmón (Fig. 1d). Por el contrario, las CDP p75^{NTR-/-} cargadas con OVA en presencia o ausencia de NGF no eran capaces de inducir inflamación de vías aéreas (datos no mostrados). Los datos de los inventores indican que el NGF desencadena las CDP que expresan p75^{NTR} en un fenotipo proinflamatorio, dando lugar a una inflamación de las vías aéreas más grave en el modelo asmático.

Ejemplo 6: El NGF regula la producción de interferón alfa (IFN α) (respuesta Th1) mediante CDP estimuladas con ODN (Oligodesoxinucleótidos)

Las CDP humanas expresan el receptor 9 tipo Toll (TLR9). El ODN 2216 estimulante (Clase A CpG ODN) se reconocen por el TLR9 expresado por las CDP. El reconocimiento de ODN 2216 por el TLR9 activa las CDP e induce la secreción de INF α antivírico (respuesta Th1). Los inventores estimularon las CDP purificadas de sangre periférica humana con ODN 2216 más menos NGF a 200 ng/ml. Después de 14 horas de estimulación el sobrenadante se recolectó y se analizó respecto a la secreción de INF α por ELISA. Los inventores utilizaron 20 muestras en el estudio durante los meses de mayo, junio y julio. Los resultados de los inventores revelaban una reducción significativa ($p = 0,0031$) en la secreción de INF α por el ODN 2216 más CDP activadas por NGF 200 en comparación con las CDP activadas con ODN 2216 sin NGF (Fig. 6a). Sin embargo, las concentraciones menores de 200 ng/ml no daban lugar a una secreción de INF α significativamente diferente por las CDP activadas con ODN 2216 en comparación con las CDP activadas por ODN 2216. El ODN 2243 de control no estimulaba las CDP para nada, por lo tanto, no se detectaba INF α en el sobrenadante.

Para probar que la regulación de la secreción de INF α en las CDP activadas por ODN 2216 por NGF es mediante CD271 y no a través de TrkA, los inventores utilizaron el TAT-Pep 5 (inhibidor de la señalización de p75^{NTR}) para rescatar la producción de INF α mediada por NGF por las CDP activadas por ODN 2216. En total se analizaron 23 muestras de capas leucocitarias. El análisis estadístico que se llevó a cabo sobre las 23 muestras colectivamente no revelaba diferencias significativas en la producción de INF α inducida por NGF por las CDP activadas por ODN 2216 comparación con la de las CDP activadas por ODN 2216 sin NGF. Solamente la excepción en las que las CDP activadas por ODN 2216 + NGF200 + Pep5 demostraba una diferencia significativa ($p = 0,0471$) en la secreción de INF α en comparación con las CDP activadas por ODN 2216 (Fig. 6b).

Sin embargo, para las muestras que presentaban una disminución de la producción de INF α dependiente de NGF, la adición de TAT-Pep5 (100 nM) recuperaba significativamente ($p = 0,0168$) la secreción de INF α mediada por NGF en las CDP activadas por ODN 2216 inhibiendo la señalización de CD271 inducida por NGF. El TAT-Pep5 por sí mismo y/o el DMSO (disolvente del TAT-Pep5) no altera la secreción de INF α en las CDP activadas por ODN 2216 en comparación con las CDP activadas por ODN 2216 sin NGF (Fig. 6b).

Ejemplo 7: El NGF promueve la proliferación de células T CD4⁺ mediada por antígeno

Las CDP son células presentadoras de antígeno profesionales. Las CDP se purificaron utilizando microperlas BDCA4⁺ y células T CD4⁺ por selección negativa a partir de sangre periférica de pacientes con alergia contra ciertos alérgenos conocidos tal como antígeno de hierba y antígeno de cobaya. Las células T CD4⁺ purificadas y marcadas con CFSE (succinimidil éster de carboxifluoresceína) se co-cultivaron por duplicado con CDP autólogas en presencia de una concentración óptima de un alérgeno/antígeno específico de alergia con y sin NGF a 5, 25 y 100 ng/ml. Después de 5 días en cultivo se determinó la proliferación de células T CD4⁺ disminuyendo la fluorescencia de CFSE. Como se muestra en la Fig. 7a, el NGF a 25 ng/ml demostraba un aumento significativo de proliferación de células T CD4⁺ mediada por antígenos (alérgenos) en comparación con las células T CD4⁺/CDP co-cultivadas sin NGF. Sin embargo, con 100 ng/ml de NGF la proliferación de células T estaba reducida considerablemente. Por el contrario, con el antígeno de control se notaba muy poca proliferación. Las células T por sí mismas (sin el cocultivo con las CDP) no presentaba ninguna proliferación si se incubaban con o sin el antígeno (alérgeno) más menos NGF o con solo NGF.

Ejemplo 8: El NGF reduce la secreción de citocinas Th1 IL-2 e IFN γ por las células T

Las CDP murinas se generaron a partir de las células de la médula ósea. Las células de la médula ósea se aislaron por extracción del fémur y tibia murinos. Los eritrocitos se lisaron utilizando un tampón de lisis ACK (Life Technologies). Las células restantes se lavaron y cultivaron a una densidad de 2×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 (Life Technologies) suplementado con un 105 de FCS, 1 mM de piruvato sódico, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomina, 10 mM de tampón HEPES y 0,1 mM de β -mercaptoetanol. Para diferenciar

las células de médula ósea en CDP, se añadieron a las células 100 ng de ligando de tirosina cinasa 3 tipo fms (Flt3-L). después de 8 días de cultivo se enriquecieron las CDP retirando las células CD11b⁺ a partir de la fracción celular no adherente utilizando Microperlas CD11b (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células muertas se excluyeron utilizando el kit de eliminación de células muertas (Miltenyi Biotec). La pureza era mayor del 95 % como se evalúa por citometría de flujo utilizando los siguientes anticuerpos: CD11c-APC Cy7 (BD Biosciences), B220-PerCP (Miltenyi Biotec), SiglecH-PE (eBioscience). Las células T murinas se aislaron de la cepa de ratón OTII que expresa la cadena alfa y cadena beta del receptor de celular T específico de la ovoalbúmina de pollo 323-339, utilizando el kit de aislamiento de células T CD⁺ (Miltenyi Biotec).

5
10 Ambas, las CDP y las células T se cultivaron durante una noche con o sin péptido 323-339 de ovoalbúmina de pollo en presencia o ausencia de NGF (100 ng/ml). Las concentraciones de citocinas de Th1 IL-2 e IFN γ en el sobrenadante se determinaron utilizando el kit CBA (BD Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante con la modificación del análisis de datos utilizando Excel de Microsoft.

15 La Figura 5 muestra la influencia del NGF en la secreción de las citocinas de Th1 IFN γ y IL-2 en el cocultivo. En presencia de CDP p75^{NTR+/+} que presentan el péptido de ovoalbúmina (OVA) a las células T, las células T secretan citocinas de Th1 IFN γ (Fig. 5a) e IL-2 (Fig. 5b). En comparación con el cocultivo con CDP p75^{NTR-/-}, las células T cocultivadas con CDP de la cepa p75^{NTR+/+} reacciona con una reducción de la secreción de ambas citocinas Th1 al añadir NGF.

20 **Ejemplo 9: La inactivación de p75NTR inhibe las respuestas inmunitarias Th2 y bloquea el desarrollo de tolerancia**

25 Los ratones heterocigotos de p75NTR se adquirieron en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EE. UU.) y se criaron en condiciones libres de patógenos en las instalaciones animales del TU Dresden. Se utilizaron ratones machos y hembras p75NTR^{+/+} y p75NTR^{-/-} a las 10-12 semanas de edad en los experimentos.

Generación de CDP

30 Las células dendríticas plasmacitoides (CDP) se generaron *in vitro* de la siguiente manera: las células de médula ósea se aislaron por extracción de fémur y tibia de ratones. Se lisaron los eritrocitos utilizando un tampón ACK. Las células restantes se lavaron y cultivaron a una densidad de 2 x 10⁶ células por mililitro en medio RPMI 1640 suplementado con un 10 % de FCS, 1 mM de piruvato sódico, 2 mM de L-glutamina, 100 UI por ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomycin, 10 mM de tampón HEPES y 0,1 mM de β -mercaptoetanol. Para diferenciar las células de médula ósea en CDP, se añadieron 100 ng/ml de Flt3-L (ligando de tirosina cinasa 3 tipo fms) a las células. Después de 8 días de cultivo las CDP se enriquecieron retirando la fracción CD11b⁺ utilizando Microperlas CD lib (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células muertas se excluyeron utilizando el Kit de eliminación de células Muertas (Miltenyi Biotec). La pureza de CDP se evaluaron por citometría de flujo (CD11b⁻CD11c⁺B220⁺Siglec-H⁺).

Inducción de asma alérgica en ratones

45 Para inducir asma alérgica, las CDP generadas *in vitro* se incubaron con 100 ug/ml de ovoalbúmina (OVA; calidad V, Sigma-Aldrich) durante 24 h. Para sensibilizar los ratones, se inyectaron 1 x 10⁶ CDP cargadas con OVA por vía intratraqueal en los pulmones de ratones anestesiados utilizando una cánula i.v. de 24GA (BD NeoflonTM). Los animales de control recibieron la misma cantidad de CDP sin OVA o PBS. Después de 10 días, los ratones se expusieron a un 1 % p/v de aerosol de OVA durante 30 min en 3 días consecutivos con el fin de inducir una reacción alérgica. 24 h después de la última provocación, los animales se sacrificaron y la reacción inmunitaria se examinó basándose en la composición celular del fluido de lavado broncoalveolar (BALF) (eosinófilos, linfocitos, macrófagos) y el espectro de citocinas inflamatorias, histología pulmonar y niveles de IgE específica de OVA en el suero sanguíneo.

Análisis de células del BALF

50 Se cuantificaron las células del BALF por citometría de flujo. Se preincubaron las células con el reactivo de bloqueo FcR para evitar la unión no específica. Se utilizaron los siguientes anticuerpos para la tinción: CD3-V500, CD4-V450, CD8-PE Cy7, CD11c-APC Cy7, B220-PE, F4/80-PerCP, SiglecF-AF647, Ly6G-FITC. Entre los linfocitos (FSC^{bajo}/SSC^{bajo}) se designaron las células T CD4⁺ auxiliares como CD3^{pos}CD4^{pos}; las células T CD8⁺ auxiliares como CD3^{pos}CD8^{pos}; las células B como CD3^{neg}B220^{pos}; entre los granulocitos (FSC^{bajo}/SSC^{alto}, Ly6G^{pos}) los eosinófilos se asignaron como SiglecF^{pos}CD11c^{pos} y los neutrófilos como SiglecF^{neg}. Los macrófagos se asignaron como células FSC^{alto} altamente fluorescentes CD11c^{pos} F4/80^{pos}. Adicionalmente, se prepararon citospinas de las células recolectadas y se tiñeron de acuerdo con el método de Pappenheim.

60

Cuantificación de las citocinas del BALF

Se utilizó el sobrenadante del BALF para la cuantificación de IL-4, IL-5 e IL-13 por ELISA (eBioscience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Análisis histológico
 Se perfundieron los pulmones con PBS y se fijaron en un 4 % de formaldehído. Se tiñeron secciones de 4 um de pulmones embebidos en parafina con tinción PAS para la cuantificación de la inflamación e hiperplasia de células de Goblet.

10 Para investigar el papel del p75NTR expresado en las CDP en el proceso de desencadenar una enfermedad, los inventores utilizaron el modelo de ratón de asma alérgica mediada por OVA. Las células CDP pulsadas con OVA de los ratones se aplicaron por vía intratraqueal en el pulmón de ratones tanto p75NTR+/+ y p75NTR-/. Después de la provocación con un aerosol de OVA se analizaron los síntomas característicos de asma como la eosinofilia grave, inflamación pulmonar y producción intensiva de mucus. Los ratones p75NTR+/+ tratados con CDP p75NTR-/- cargadas con OVA que mostraban un número significativamente reducido de células inmunitarias en el BALF (linfocitos y eosinófilos) en comparación con los ratones que recibían CDP p75NTR+/+ (Fig. 2a, b). La respuesta inmunitaria mediada por OVA daba lugar adicionalmente al aumento de la secreción de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en el BALF de los ratones tratados con CDP p75NTR+/+ pero no en los ratones que recibían CDP p75NTR-/- (Fig. 2c). La inflamación perivascular y la hiperplasia de células de Goblet en el pulmón disminuía en los ratones tratados con CDP p75NTR-/- en comparación con los ratones tratados con CDP p75NTR+/+ (Fig. 2d, e). En resumen, los ratones recibían CDP que carecían de p75NTR desarrollaban significativamente menos asma alérgica.

25 Se sabía en la técnica que el bloqueo o eliminación del en los ratones evitaba el desarrollo de inflamación pulmonar e hiperrespuesta de vías aéreas. En el presente estudio, sin embargo, se puede demostrar por primera vez que se puede inducir asma alérgica en ratones p75NTR-/- por aplicación intratraqueal de CDP p75NTR+/+ cargadas con OVA. Por el contrario, la aplicación de CDP p75NTR-/- cargadas con OVA no induce asma. En detalle, las células inmunitarias aumentaban significativamente en el BALF de ratones p75NTR-/- que recibían CDP p75NTR+/+ (Fig. 2a, b). Además, el perfil de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) está aumentado significativamente en comparación con los ratones que recibían CDP p75NTR-/- (Fig. 2c). El examen histológico del tejido pulmonar revelaba que los ratones tratados con CDP p75NTR+/+ desarrollaban inflamación perivascular grave e hiperplasia de células de Goblet en comparación con los ratones que recibían CDP p75NTR-/- (Fig. 2d, e).

35 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Technische Universität Dresden

40 <120> Métodos de cribado y ensayo basado en células para moduladores de la señalización de p75NTR

<130> TUD106EP

<160>4

45 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Glu Gly Glu Lys Leu His Ser Asp Ser Gly Ile Ser Val Asp Ser
 1 5 10 15

55 <210>2
 <211>9
 <212> PRT
 60 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 699 410 T3

Arg Pro Thr Ile Pro Arg Asn Pro Lys
 1 5

5 <210>3
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 3

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys
 20 25 30

Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn
 35 40 45

Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys
 50 55 60

Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr
 65 70 75 80

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser

ES 2 699 410 T3

			85					90					95			
Ala	Pro	Cys	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Ala	Val	Cys	Arg	Cys	Ala	Tyr	Gly	
			100					105					110			
Tyr	Tyr	Gln	Asp	Glu	Thr	Thr	Gly	Arg	Cys	Glu	Ala	Cys	Arg	Val	Cys	
		115					120					125				
Glu	Ala	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Phe	Ser	Cys	Gln	Asp	Lys	Gln	Asn	Thr	
	130					135					140					
Val	Cys	Glu	Glu	Cys	Pro	Asp	Gly	Thr	Tyr	Ser	Asp	Glu	Ala	Asn	His	
145					150					155					160	
Val	Asp	Pro	Cys	Leu	Pro	Cys	Thr	Val	Cys	Glu	Asp	Thr	Glu	Arg	Gln	
				165					170					175		
Leu	Arg	Glu	Cys	Thr	Arg	Trp	Ala	Asp	Ala	Glu	Cys	Glu	Glu	Ile	Pro	
			180					185					190			
Gly	Arg	Trp	Ile	Thr	Arg	Ser	Thr	Pro	Pro	Glu	Gly	Ser	Asp	Ser	Thr	
		195					200					205				
Ala	Pro	Ser	Thr	Gln	Glu	Pro	Glu	Ala	Pro	Pro	Glu	Gln	Asp	Leu	Ile	
	210					215					220					
Ala	Ser	Thr	Val	Ala	Gly	Val	Val	Thr	Thr	Val	Met	Gly	Ser	Ser	Gln	
225					230					235					240	
Pro	Val	Val	Thr	Arg	Gly	Thr	Thr	Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Val	Tyr	Cys	
				245				250						255		
Ser	Ile	Leu	Ala	Ala	Val	Val	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Tyr	Ile	Ala	Phe	
			260					265					270			
Lys	Arg	Trp	Asn	Ser	Cys	Lys	Gln	Asn	Lys	Gln	Gly	Ala	Asn	Ser	Arg	
		275					280					285				
Pro	Val	Asn	Gln	Thr	Pro	Pro	Pro	Glu	Gly	Glu	Lys	Leu	His	Ser	Asp	
	290					295					300					
Ser	Gly	Ile	Ser	Val	Asp	Ser	Gln	Ser	Leu	His	Asp	Gln	Gln	Pro	His	
305					310					315					320	
Thr	Gln	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Ala	Leu	Lys	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Tyr	
				325					330					335		

ES 2 699 410 T3

Ser Ser Leu Pro Pro Ala Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu Asn
 340 345 350

Gly Ser Ala Gly Asp Thr Trp Arg His Leu Ala Gly Glu Leu Gly Tyr
 355 360 365

Gln Pro Glu His Ile Asp Ser Phe Thr His Glu Ala Cys Pro Val Arg
 370 375 380

Ala Leu Leu Ala Ser Trp Ala Thr Gln Asp Ser Ala Thr Leu Asp Ala
 385 390 395 400

Leu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gln Arg Ala Asp Leu Val Glu Ser
 405 410 415

Leu Cys Ser Glu Ser Thr Ala Thr Ser Pro Val
 420 425

5 <210>4
 <211> 3420
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 4

ES 2 699 410 T3

agagcgagcc gagccgaggc cagctccggc gggcaggggg ggcgctggag cgcagcgag	60
cgcagcccca tcagtcgca aagcggaccg agctggaagt cgagcgctgc cgcgggaggc	120
ggcgatggg ggcaggtgcc accggccgcg ccatggacgg gccgcgctg ctgctgttc	180
tgcttctggg ggtgtccctt ggaggtgcca aggaggcatg cccacaggc ctgtacacac	240
acagcgggta gtgctgcaaa gcctgcaacc tgggcgaggg tgtggcccag ccttgtggag	300
ccaaccagac cgtgtgtgag ccctgcctgg acagcgtgac gttctccgac gtgggtgagc	360
cgaccgagcc gtgcaagcog tgcaccgagt gcgtggggct ccagagcatg tcggcgccgt	420
gcgtggaggc cgacgagcc gtgtgccgct gcgcctacgg ctactaccag gatgagacga	480
ctggcgctg cgaggcgtgc cgcgtgtgcy aggcgggctc ggcctcgtg ttctctgcc	540
aggacaagca gaacaccgtg tgcgaggagt gcccgcagcg cacgtattcc gacgaggcca	600
accacgtgga cccgtgcctg ccctgcaccg tgtgcgagga caccgagcgc cagctccgcg	660
agtgcacacg ctgggcccag gccgagtgcg aggagatccc tggccgttgg attacacggt	720
ccacaccccc agagggtcg gacagcacag ccccagcac ccaggagcct gaggcacctc	780
cagaacaaga cctcatagcc agcacggtgg caggtgtggt gaccacagtg atgggcagct	840
cccagcccgt ggtgaccoga ggcaccaccg acaacctcat cctgtctat tgctccatcc	900
tggtctgtgt ggttgtgggc cttgtggcct acatagcctt caagaggtgg aacagctgca	960
agcagaacaa gcaaggagcc aacagccggc cagtgaacca gacgccccca ccagagggag	1020

ES 2 699 410 T3

aaaaactcca cagcgacagt ggcatctccg tggacagcca gagcctgcat gaccagcage 1080
 cccacacgca gacagcctcg ggccaggccc tcaaggggtga cggaggcctc tacagcagcc 1140
 tgcccccagc caagcgggag gaggtggaga agcttctcaa cggctctgcg ggggacacct 1200
 ggcggcacct ggcgggcgag ctgggctacc agcccagca catagactcc tttacccatg 1260
 aggcctgccc cgttcgcgcc ctgcttgcaa gctgggccc ccaggacagc gccacactgg 1320
 acgccctcct ggcgccctg cgcgcctcc agcagccga cctcgtggag agtctgtgca 1380
 gtgagtccac tgccacatcc ccggtgtgag cccaaccggg gagccccgc cccgccccac 1440
 attccgaaa ccgatgctcc agccaacccc tgtggagccc gcacccccac cctttggggg 1500
 gggcccgctt ggcagaactg agctcctctg ggcaggacct cagagtccag gccccaaaac 1560
 cacagccctg tcagtgcagc ccgtgtggcc ccttcacttc tgaccacact tcctgtccag 1620
 agagagaagt gccctgctg cctccccaac cctgcccctg ccccgctacc atctcagccc 1680
 acctgcccc ttctcccaca ctgctaggtg ggccagcccc tcccaccaca gcaggtgtca 1740
 tatatggggg gccaacacca gggatggtac tagggggaag tgacaaggcc ccagagactc 1800
 agagggagga atcgaggaac cagagccatg gactctacac tgtgaacttg ggaacaagg 1860
 gtggcatccc agtggcctca accctccctc agcccctctt gccccccacc ccagcctaag 1920
 atgaagagga tcggaggctt gtcagagctg ggagggggtt tcgaagctca gcccaacccc 1980
 ctcatthttg atataggtca gtgaggcca gggagaggcc atgattcgc caaagccaga 2040
 cagcaacggg gagccaagt gcaggctggc accgcctctc ctaaagagg ggcctcaggt 2100
 ttgcctgagg gcgaggggag ggtggcaggt gacctctctg gaaatggctt gaagccaagt 2160
 cagctttgcc ttccacgctg tctccagacc cccaccccct cccactgcc tgcccacccg 2220
 tggagatggg atgcttgccct agggcctggt ccatgatgga gtcaggtttg gggttcgtgg 2280
 aaaggggtgct gcttccctct gcctgtccct ctcaggcatg cctgtgtgac atcagtggca 2340
 tggctccagt ctgctgccc ccatcccagc atggaccogg agctaacact ggcacctaga 2400
 atcagcctag ggtcagggg ccaaggacc ctcaccttgc aacacacaga cacacgcaca 2460
 cacacacaca ggaggagaaa tctcactttt ctccatgagt tttttctctt ggctgagac 2520
 tggatactgc ccggggcagc tgccagagaa gcatcggagg gaattgaggt ctgctcggcc 2580
 gtcttcactc gccccgggt ttggcgggcc aaggactgcc gaccgaggct ggagctggcg 2640
 tctgtcttca agggcttaca cgtggaggaa tgctcccca tctcccctt ccctgcaaac 2700
 atggggttgg ctgggcccag aaggttgtga tgaagaaaag tgggccagtg tgggaatgog 2760
 gcaagaagga attgacttgg actgtgacct gtggggattt ctcccagctc tagacaaccc 2820
 tgcaaaggac tgttttttcc tgagcttggc cagaaggggg ccatgaggcc tcagtggact 2880

ES 2 699 410 T3

ttccaccccc	tcocctggcct	gttctgtttt	gcctgaagtt	ggagtgagtg	tggtccocct	2940
ctatntagca	tgacaagccc	caggcaggct	gtgcgctgac	aaccaccgct	cccagocca	3000
gggttcccc	agocctgtgg	aagggactag	gagcactgta	gtaaattggca	attctttgac	3060
ctcaacctgt	gatgagggga	ggaaactcac	ctgctggccc	ctcacctggg	cacctgggga	3120
gtgggacaga	gtctgggtgt	atatttttc	ctcccagca	ggtggggagg	gggtttggg	3180
gcttgcaagt	atgttttagc	atgtgtttgg	ttctggggcc	cctttttact	ccccttgagc	3240
tgagatggaa	cccttttggc	ccccgagctg	ggggccatga	gctccagacc	cccagcaacc	3300
ctcctatcac	ctcccctcct	tgctoctgt	gtaatcattt	cttgggcoct	cctgaaactt	3360
acacacaaaa	cgttaagtga	tgaacattaa	atagcaaaga	aagaaaaata	gtacaaagag	3420

REIVINDICACIONES

1. Un método de cribado de agonistas y antagonistas de la señalización de p75^{NTR} que comprende las etapas de:
- 5
- Poner en contacto células dendríticas plasmacitoides (CDP) humanas o animales, primarias o generadas *in vitro*, o líneas celulares de CDP que expresan el receptor del factor de crecimiento de nervios p75^{NTR}, con una sustancia de ensayo;
 - Incubar dichas CDP, o líneas celulares de CDP humanas o animales que se pusieron en contacto, durante un periodo de tiempo que sea suficiente para efectuar la señalización del p75^{NTR};
- 10
- Determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre las CDP humanas o animales, primarias o generadas *in vitro*, o las líneas celulares de CDP;
 - Comparar el efecto de la sustancia de ensayo sobre las CDP humanas o animales, primarias o generadas *in vitro*, o las líneas celulares de CDP que se pusieron en contacto, con células o líneas celulares de control; y
 - Seleccionar una sustancia de ensayo que agonice o antagonice con la señalización de p75^{NTR} en CDP humanas o animales, primarias o generadas *in vitro*, o en líneas celulares de CDP.
- 15
2. El método de cribado de la reivindicación 1, en el que las CDP humanas o animales o las líneas celulares de CDP expresan el receptor del factor de crecimiento de nervios p75^{NTR} y/o al menos una proteína seleccionada de entre el grupo de receptores tipo Toll, preferentemente TLR4, TLR7 o TLR9.
- 20
3. El método de cribado de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las CDP humanas o animales o las líneas celulares de CDP se han modificado genéticamente para que sobreexpresen p75^{NTR} y/o al menos una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en TLR9, TLR7, TRAF3 y TRAF6.
- 25
4. El método de cribado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las células de control o las líneas celulares son células primarias, más adecuadamente CDP; o células que no expresan naturalmente el p75^{NTR} o células en las que el p75^{NTR} se ha inactivado o células en las que la expresión del p75^{NTR} se ha bloqueado, reducido o inhibido.
- 30
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las CDP o las líneas celulares que expresan p75^{NTR} se coincuban con células T, que comprende las etapas de:
- Poner en contacto CDP humanas o animales o una línea celular de CDP que expresan el receptor del factor de crecimiento de nervios p75^{NTR}, que se coincubaron con células T, con una sustancia de ensayo;
- 35
- Incubar dicho cocultivo de CDP humanas o animales, o línea celular de CDP, y dichas células T que se pusieron en contacto, durante un periodo de tiempo que sea suficiente para efectuar la señalización de p75^{NTR};
 - Determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre las CDP o las líneas celulares de CDP y sobre las células T;
 - Comparar el efecto de la sustancia de ensayo en las CDP o las líneas celulares de CDP y/o las células T que se pusieron en control con células o líneas celulares de control y/o células T; y
 - Seleccionar una sustancia de ensayo que agonice o antagonice la señalización de p75^{NTR}.
- 40
6. El método de cribado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de poner en contacto las CDP humanas o animales o las líneas celulares de CDP que expresan el receptor del factor de crecimiento de nervios p75^{NTR}, con dicha sustancia de ensayo, se lleva a cabo en presencia de un ligando natural de p75^{NTR} en condiciones que permitan la interacción de la sustancia de ensayo y el p75^{NTR} proteico y/o la interacción de la sustancia de ensayo con el ligando natural de p75^{NTR}.
- 45
7. El método de cribado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las CDP o las líneas celulares de CDP se preactivan antes o durante su uso en el método de cribado, adecuadamente con al menos un agonista de la señalización del receptor tipo Toll.
- 50
8. El método de cribado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el efecto antagonista o agonista de la sustancia de ensayo sobre la señalización del p75^{NTR} en el ensayo se mide basándose en el análisis de expresión de citocinas o el análisis de las cascadas de señalización intracelular o el análisis de expresión del marcador de superficie o la medición de la captación, el procesamiento intracelular y la presentación de antígenos externos o el análisis de la proliferación de células T.
- 55
9. El método de cribado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho método se lleva a cabo *in vivo*, caracterizado porque las CDP o las líneas celulares de CDP que expresan p75^{NTR} y/o al menos un receptor tipo Toll, preferentemente TLR7 y/o TLR9, se administraron a un modelo animal, por ejemplo, un modelo animal que sea específico de una enfermedad inmunitaria, inflamatoria o proliferativa tal como un modelo de asma alérgica inducida por OVA, otro modelo de enfermedades alérgicas, el modelo EAE, el modelo de diabetes, el modelo de LES, el modelo de trasplante, el modelo de la GvHD y el modelo tumoral.
- 60
- 65

10. El método de cribado de la reivindicación 9, en el que la determinación del efecto antagonista o agonista de una sustancia de ensayo en dichos modelos animales se lleva a cabo en presencia de animales de control, preferentemente animales de control que comprenden al menos las CDP pero en las que no se expresa el p75^{NTR} o se expresa a niveles menores, o en los que las CDP o las líneas celulares de CDP que se aplican presentan una expresión de p75^{NTR} reducida, bloqueada o inhibida.
11. Una combinación que comprende al menos un modulador de señalización del p75^{NTR} en CDP seleccionado de entre un antagonista del p75^{NTR} o un agonista del p75^{NTR} y al menos un agonista del TLR9, en donde dicho agonista de la señalización del p75^{NTR} se selecciona de entre
- i) el grupo que comprende NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5;
 - ii) un anticuerpo activante, que es el anticuerpo MC192 anti- p75^{NTR};
 - iii) péptidos activantes y moléculas pequeñas activantes seleccionadas de entre LM11A-24 o LM11A-31 y LM11A-36.
- en donde dicho antagonista de la señalización de p75^{NTR} se selecciona de entre
- i) el grupo que comprende pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT-3, pro-NT-4, y pro-NT-5;
 - ii) anticuerpos bloqueantes seleccionados de entre los clones ME20.4, MLR2, HB-8737, NGFR5 de anticuerpos monoclonales anti- p75^{NTR} humano y versiones humanizadas de los mismos; AB1554
 - iii) y Tanezumab, PG110, REGN475, y Fulranumab;
 - iv) el péptido bloqueante tat-PEP5; v) péptidos que bloquean la interacción de p75^{NTR} con TRAF6 que son péptidos de unión al motivo proteico EGEKLHSDSGISVDS (SEQ ID NO. 1) del dominio intracelular del p75^{NTR}; y péptidos TRAF6 señuelo que comprenden el péptido RPTIPRNPK (SEQ ID NO. 2);
 - v) moléculas pequeñas seleccionadas de entre derivados de 2-oxo-alquil-1-piperacina-2-ona, PD90780, ALE-0540, Ro 08-2750 e Y1036;
 - vi) morfolinós que bloquean la expresión del p75^{NTR}; o
 - vii) un ARNhp o ARNi que bloquea la expresión de p75^{NTR} o la señalización corriente abajo; y
- en donde dicho agonista de TLR9 se selecciona de entre ADN bacteriano, CPG-ODN Clase A, que se seleccionan de entre ODN 1585, ODN 2216, ODN 2336; CPG-ODN Clase B, que se seleccionan de entre ODN BW006, ODN D-SL01, ODN 1668; ODN 1826, ODN 2006, ODN 2007 y CPG-ODN Clase C, que se seleccionan de entre ODN D-SL03, ODN 2395, ODN M362 y ODN C792.
12. Una composición farmacéutica que comprende la combinación de la reivindicación 11.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, que es una composición vacunal.
14. La composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende adicionalmente al menos un agente inmunoestimulante, que se selecciona de entre monofosforil lipido A, muramil dipéptido, oligodesoxinucleótidos, ARN de doble cadena, patrones moleculares asociados a patógenos alternativos, saponinas, resiquimod, citocinas, quimiocinas y antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*.
15. La composición vacunal de acuerdo con las reivindicaciones 13 o 14, que comprende adicionalmente al menos un agente seleccionado de entre compuestos de aluminio insolubles, fosfato cálcico, liposomas, micropartículas, emulsiones, partículas tipo virus y vectores víricos.
16. La composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende adicionalmente CDP aisladas que expresan p75^{NTR}, CDP generadas *in vitro* que expresan p75^{NTR} o una línea celular de CDP que expresa p75^{NTR}.
17. La combinación de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso como un adyuvante vacunal.
18. La combinación de acuerdo con la reivindicación 11 o la composición vacunal o farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-17 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades neurodegenerativas centrales o periféricas, demencia senil, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Down, enfermedades priónicas, amnesia, esquizofrenia, depresión, trastorno bipolar, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, afecciones cardiovasculares, daño cardíaco post-isquémico, cardiomiopatías, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, isquemia cardíaca, infarto cerebral, neuropatías periféricas, daño del nervio óptico y/o de la retina, degeneración retiniana pigmentaria, glaucoma, isquemia retiniana, degeneración macular, traumatismos de la médula espinal, traumatismos craneales, aterosclerosis, estenosis, trastornos de cicatrización de heridas, alopecia, cualquier tipo de cáncer, cualquier tipo de tumores, cualquier tipo de metástasis, cualquier tipo de leucemia, trastornos respiratorios, inflamación pulmonar, alergia, anafilaxia, asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dolor cutáneo, dolor somático, dolor visceral, dolor neurológico, dolor neuropático crónico, dolor inflamatorio, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide (poliartritis, oligoartritis), espondilitis anquilosante, colagenosis, lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de SHARP, síndrome de Sjögren, escleroderma, polimiositis,

dermatomiositis, esclerosis sistémica progresiva, espondiloartritis (enfermedad de Bechterew, artritis reactiva, artritis enteropática, artritis psoriásica, espondiloartritis no diferenciada), fiebre reumática, síndrome de Aicardi-Goutieres, vasculitis, enfermedad de granulomatosis de Wegener, nefritis, ictus, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, enfermedad de Whipple, esclerodema, enfermedad de Stiffs, displasia broncopulmonar (BPD), bronquiolitis, 5 bronquiolitis asociada a RSV, diabetes mellitus, síndrome de fibromialgia, enfermedad celíaca, enfermedad de Hashimoto, hipotiroidismo, hipertiroidismo, enfermedad de Addison, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), trombocitopenia autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, síndrome del Löfgren, enfermedad de Behcet, síndrome nefrótico, uveítis, artritis psoriásica, psoriasis (psoriasis en placa, psoriasis pustular), fracturas óseas, enfermedades óseas, osteoporosis y todas las enfermedades infecciosas bacterianas, fúngicas, víricas, así como las 10 infecciones con parásitos eucariotas.

Figura 1a

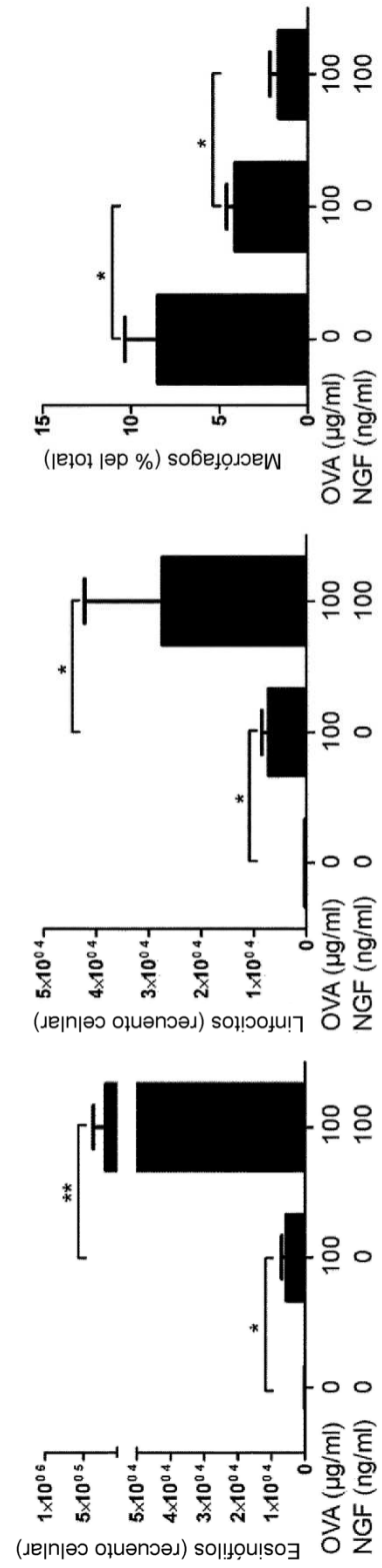


Figura 1b

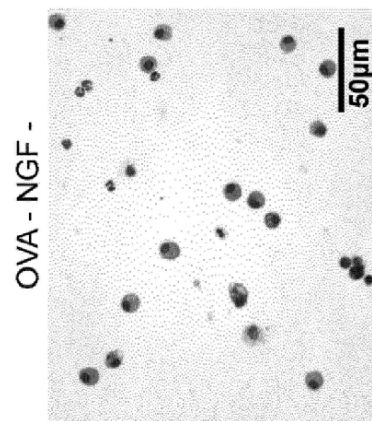
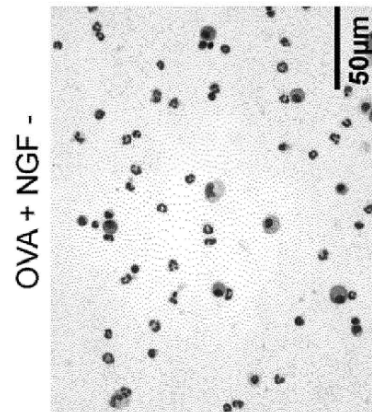
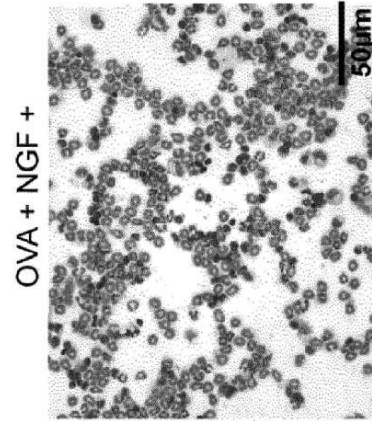


Figura 1c

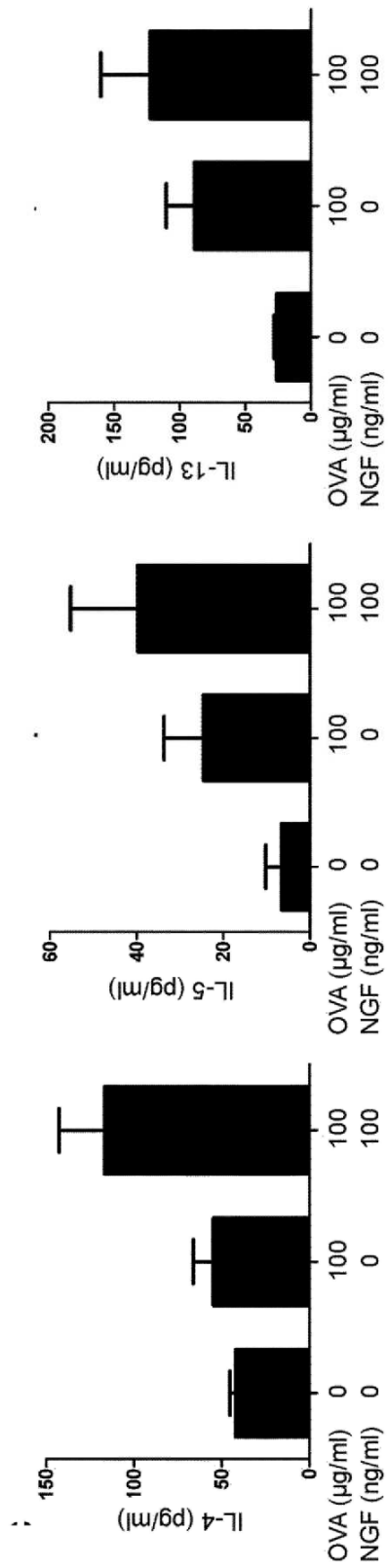


Figura 1d

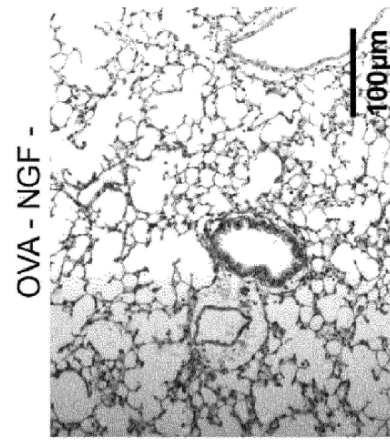
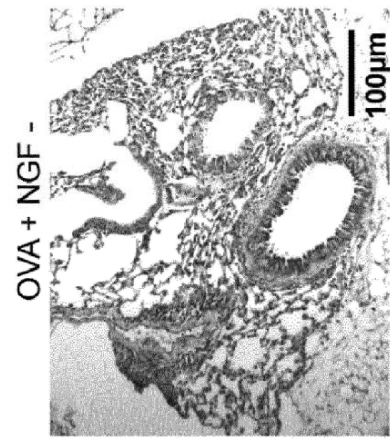
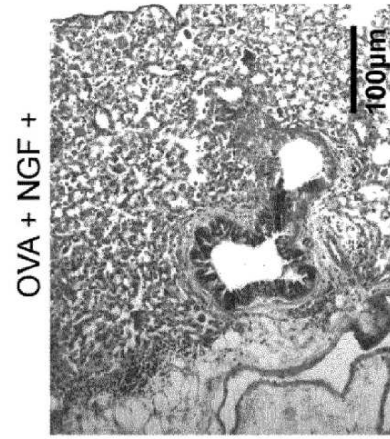


Figura 2a

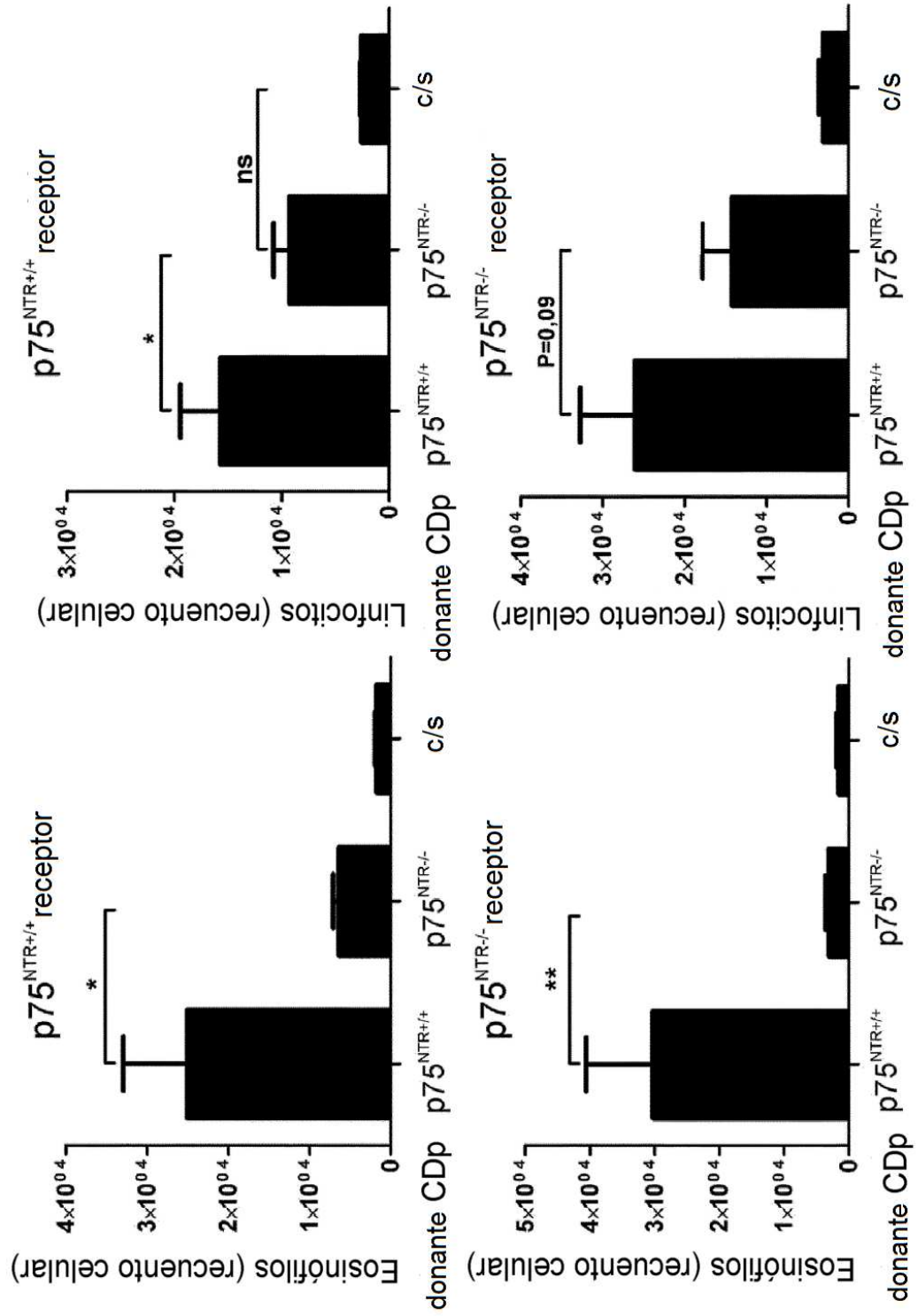


Figura 2b

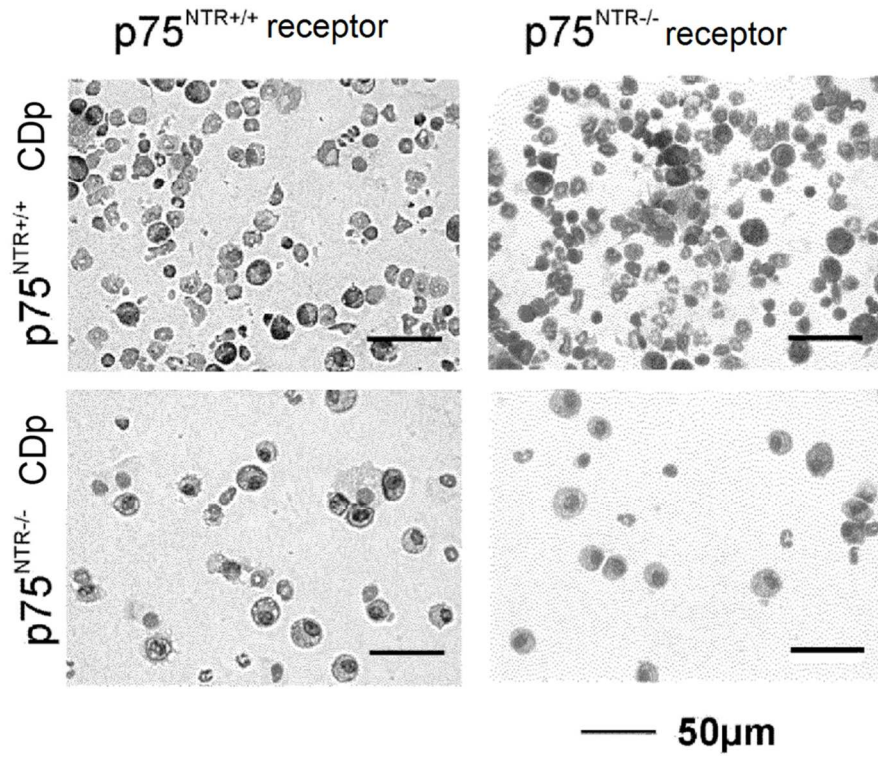


Figura 2c

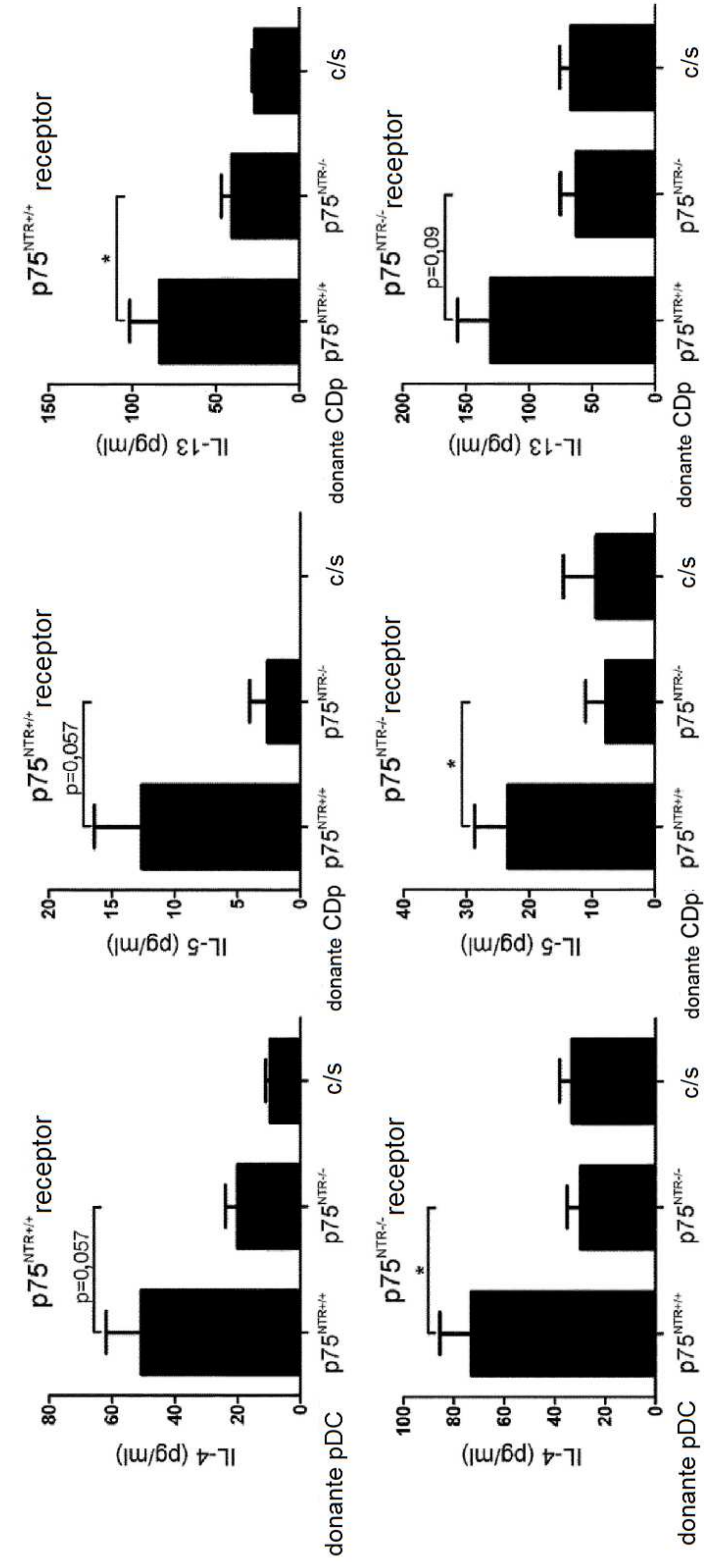


Figura 2d

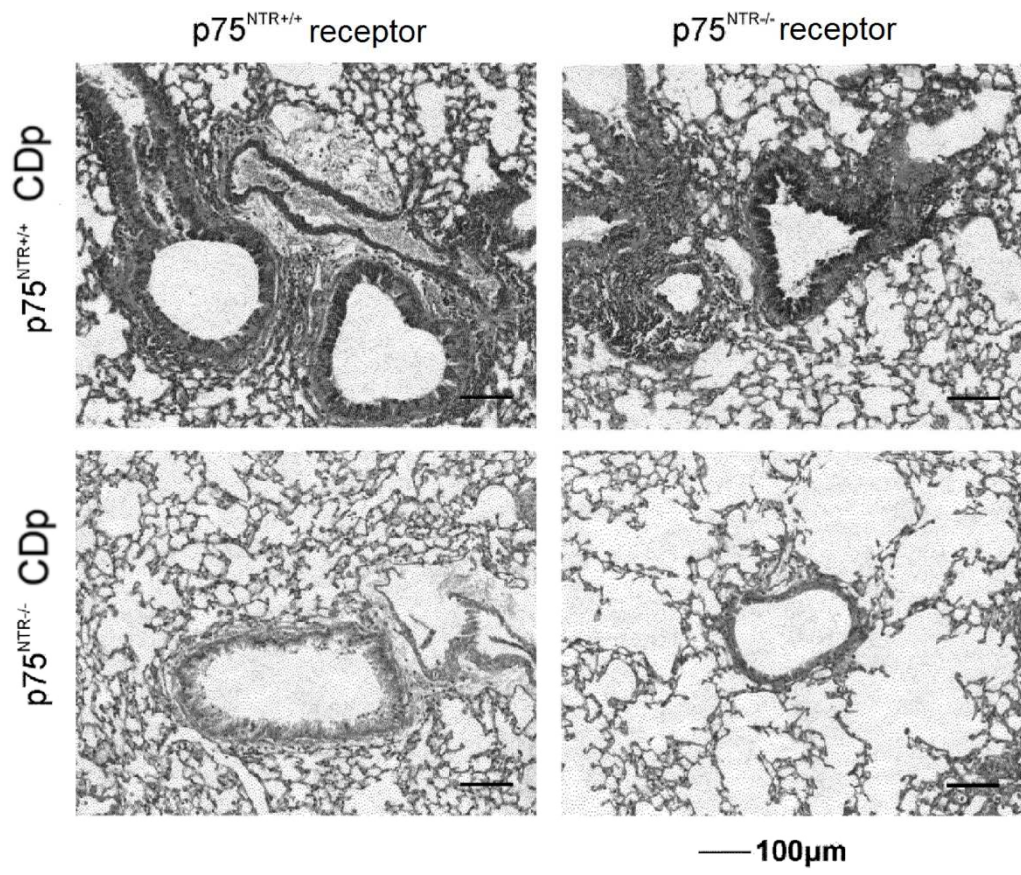


Figura 2e

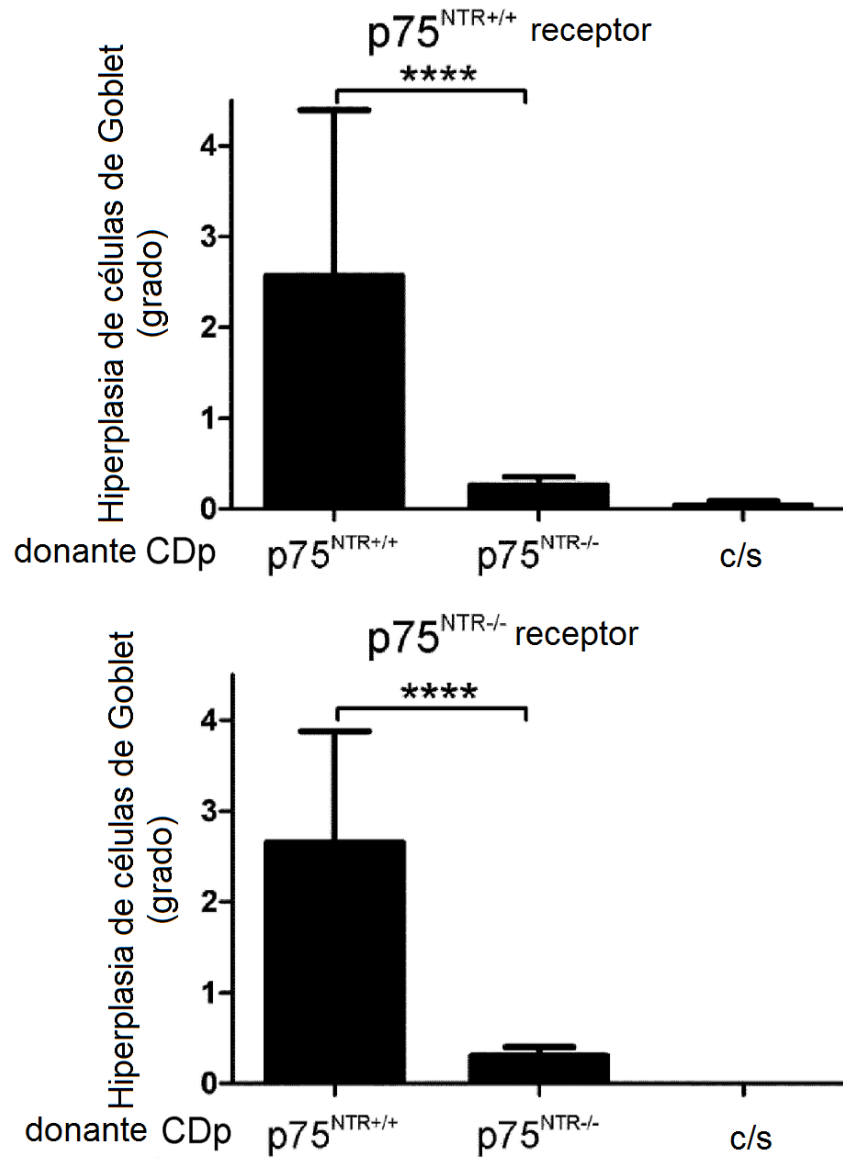


Figura 3a

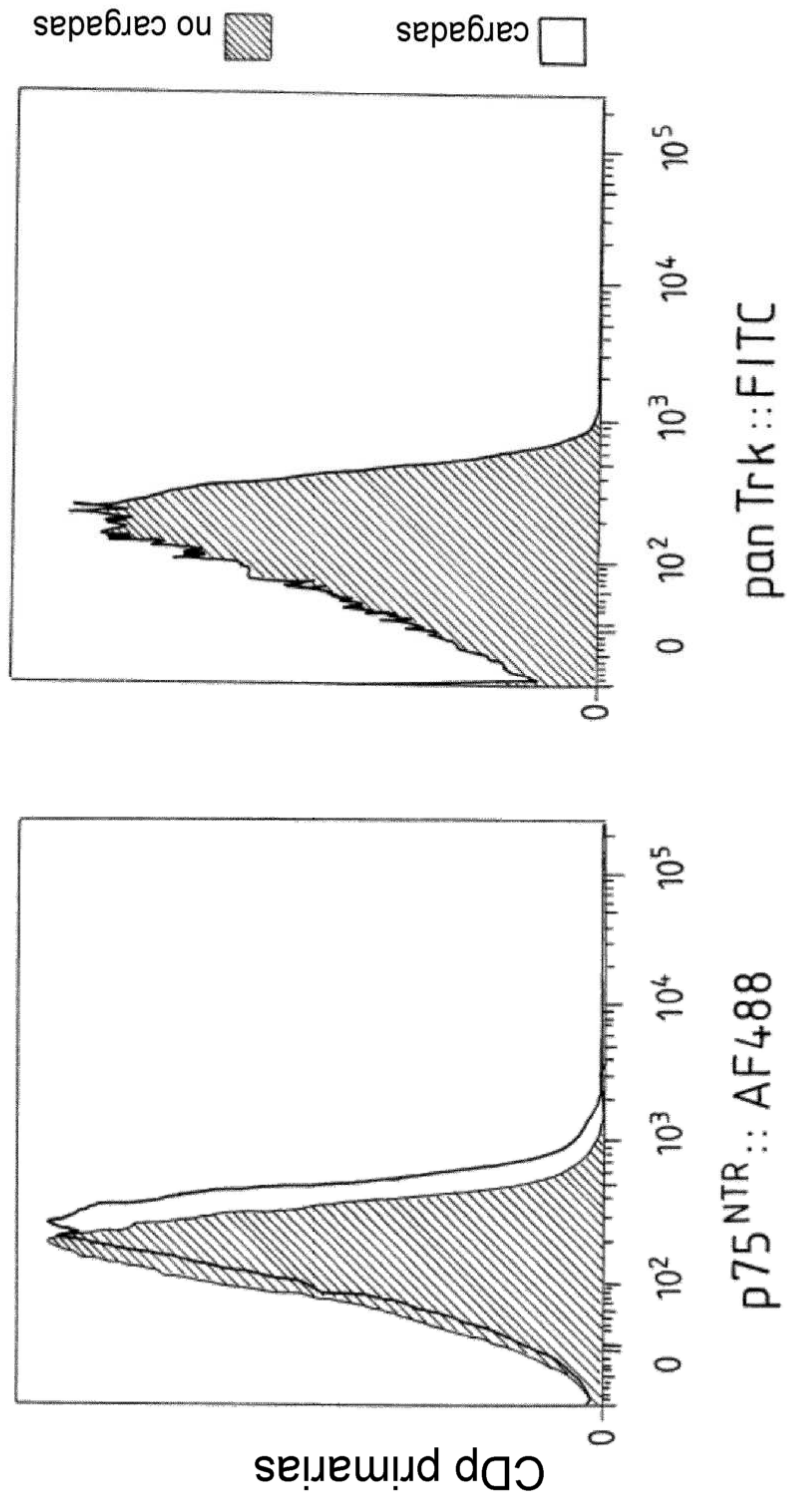


Figura 3b

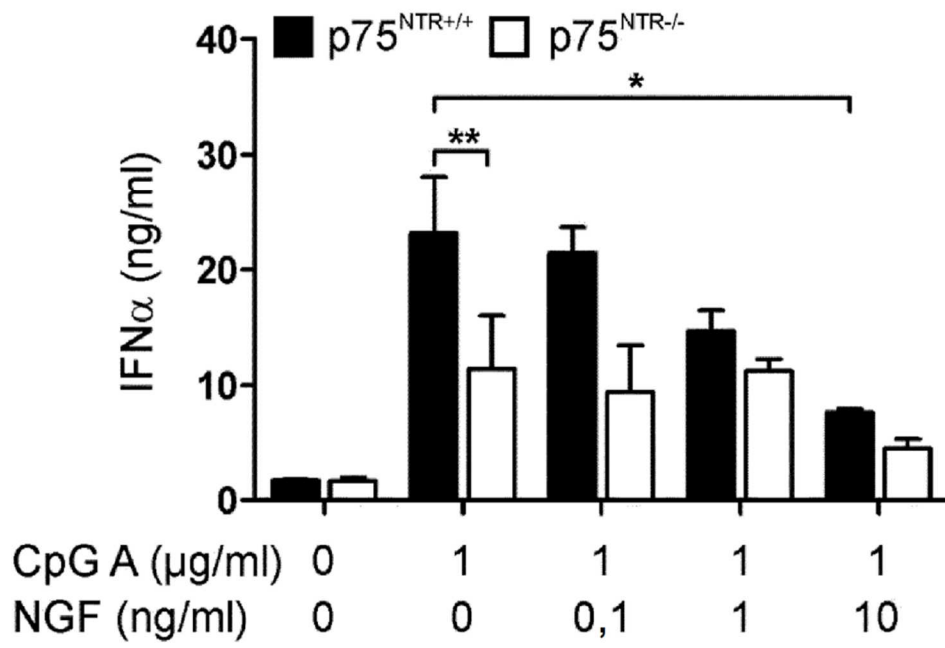


Figura 3c

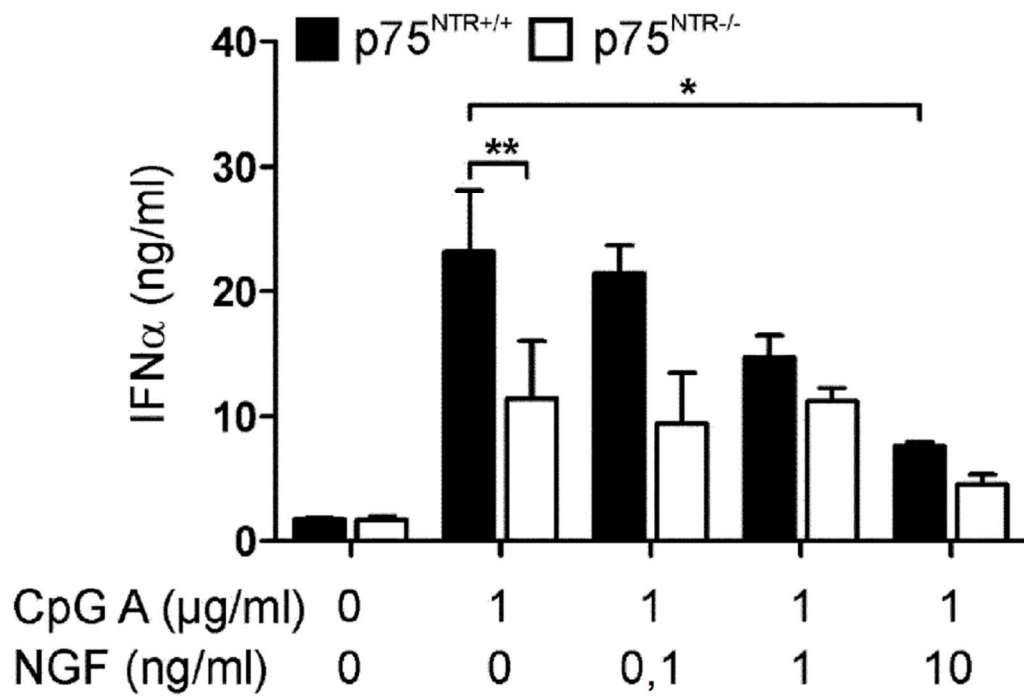


Figura 3d

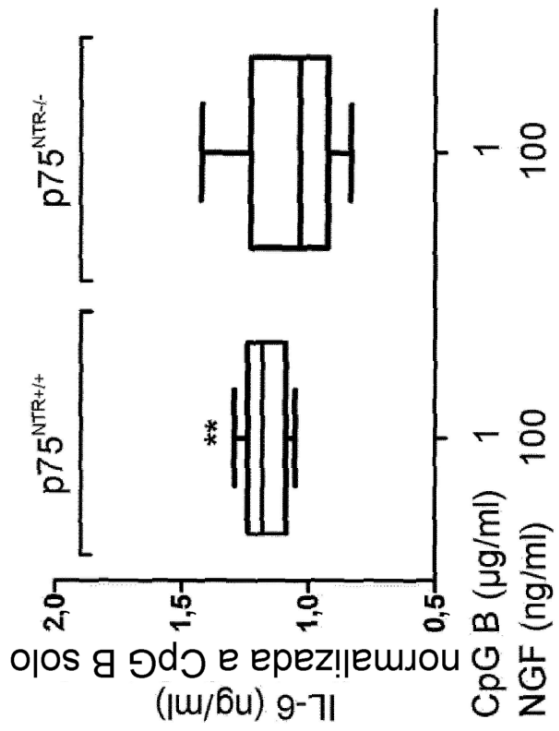
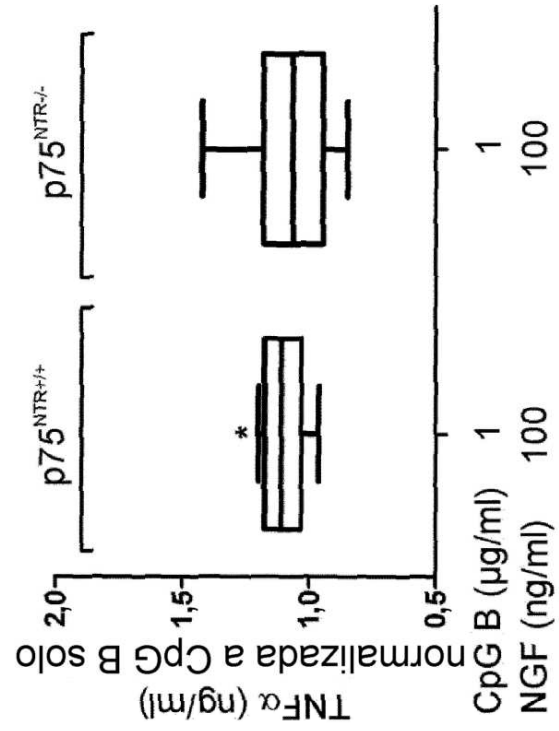


Figura 3e

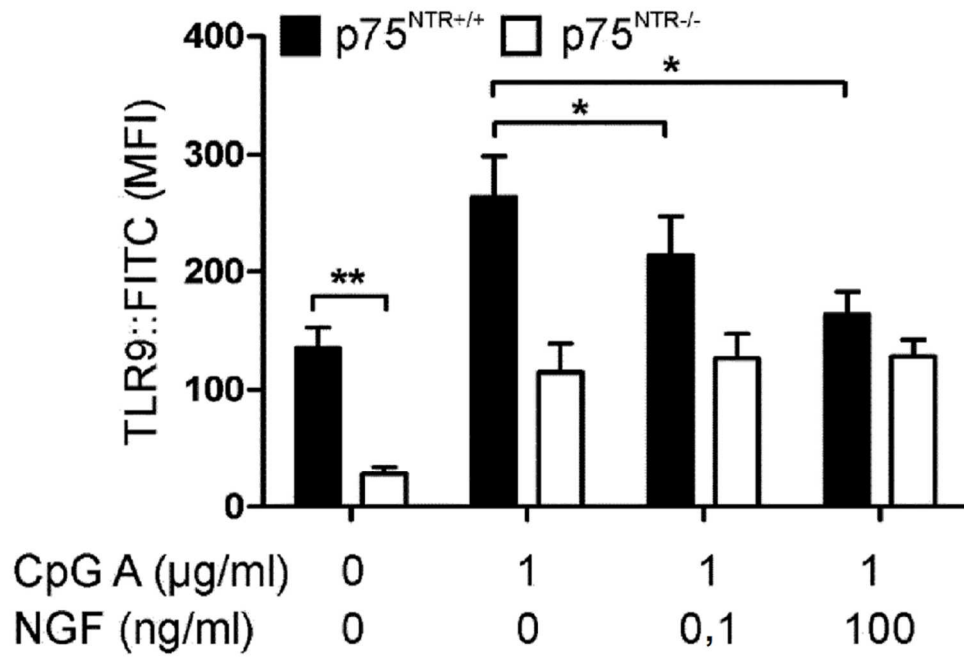


Figura 3f

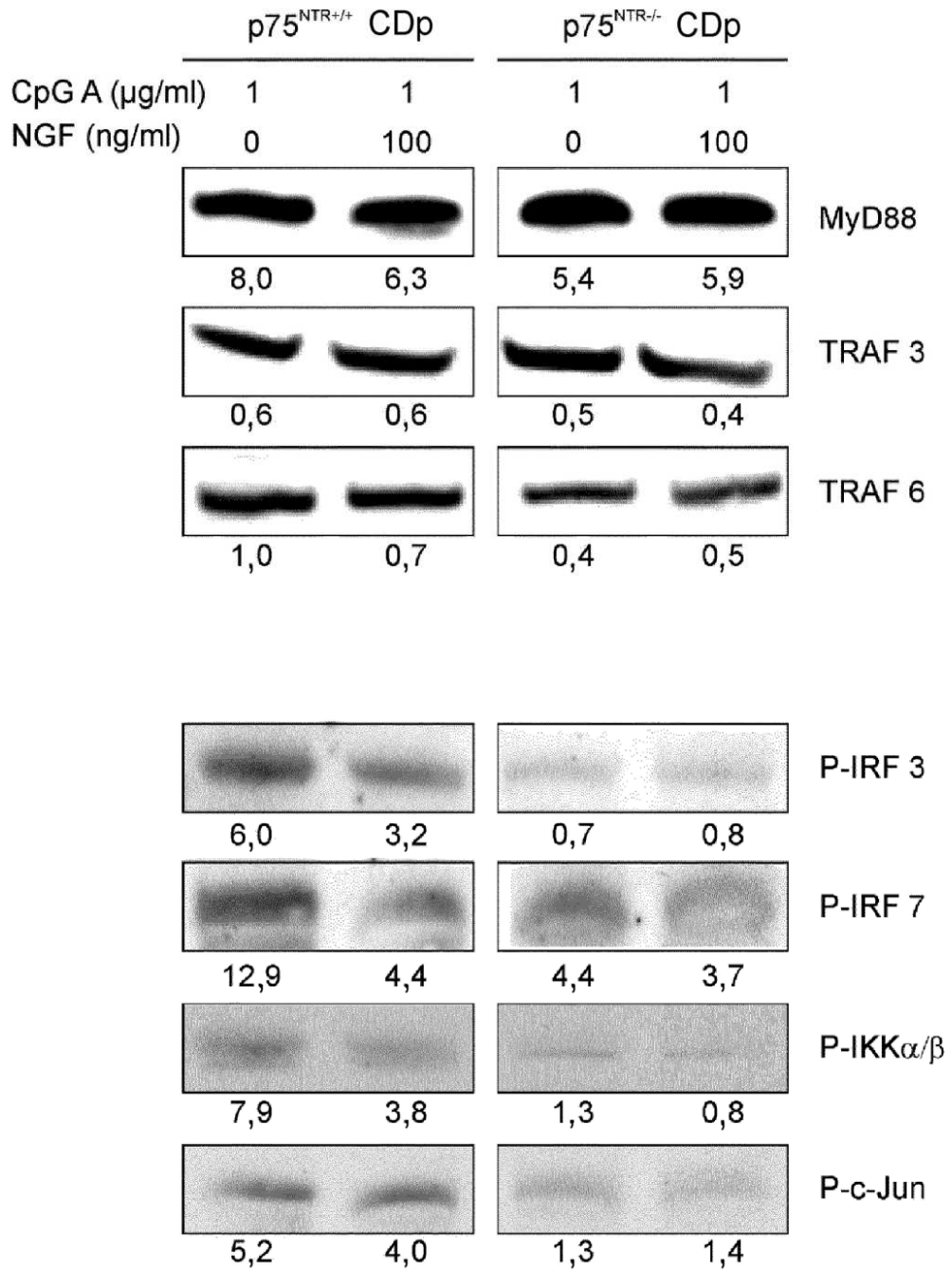


Figura 3g

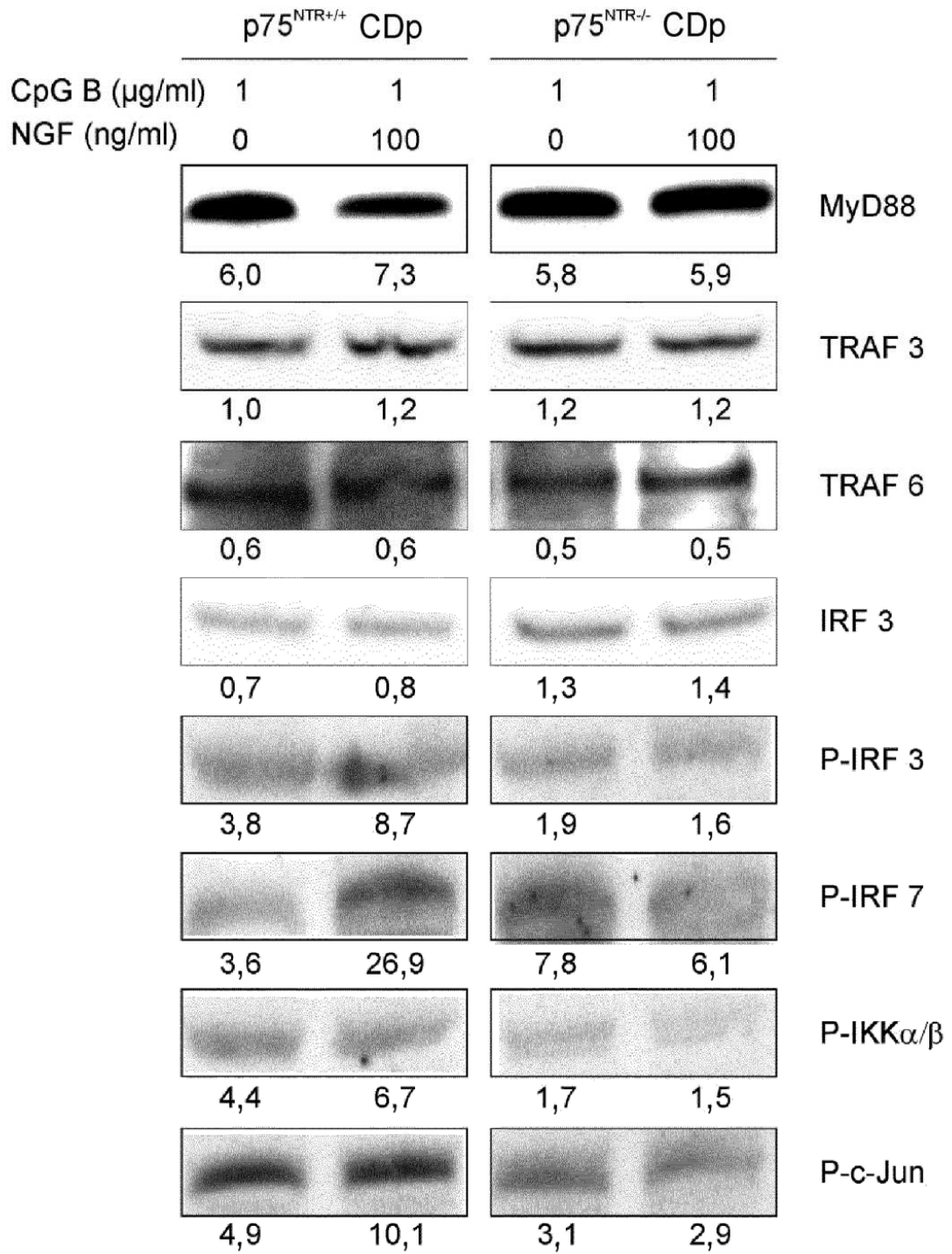


Figura 4a

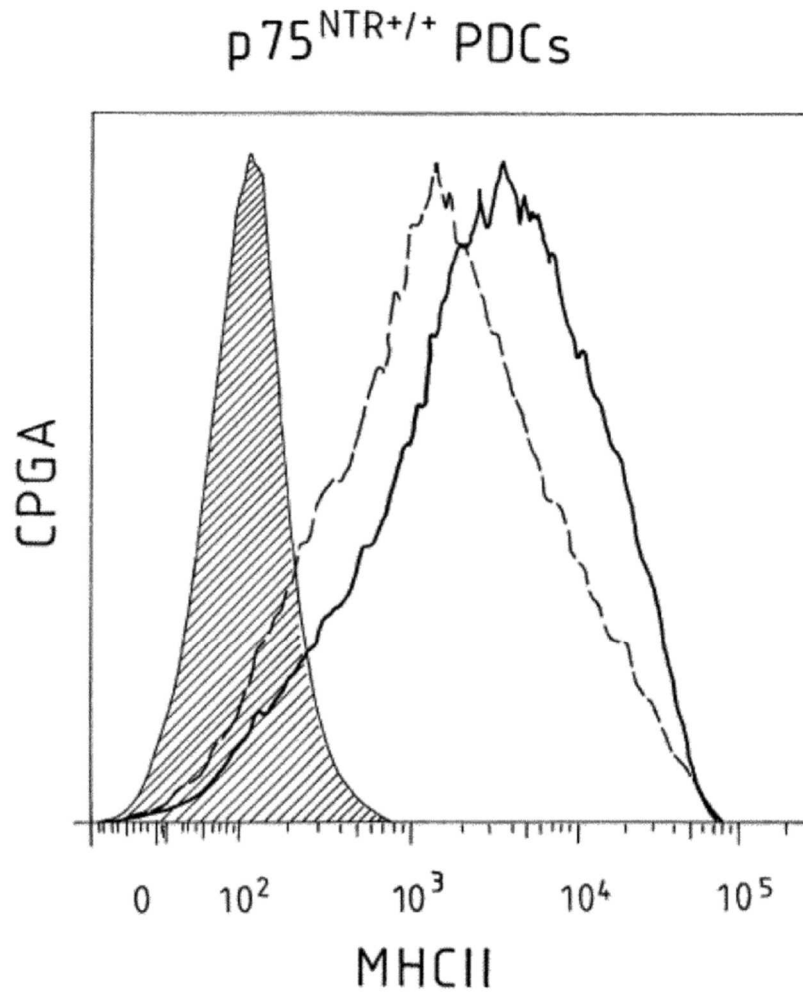


Figura 4b

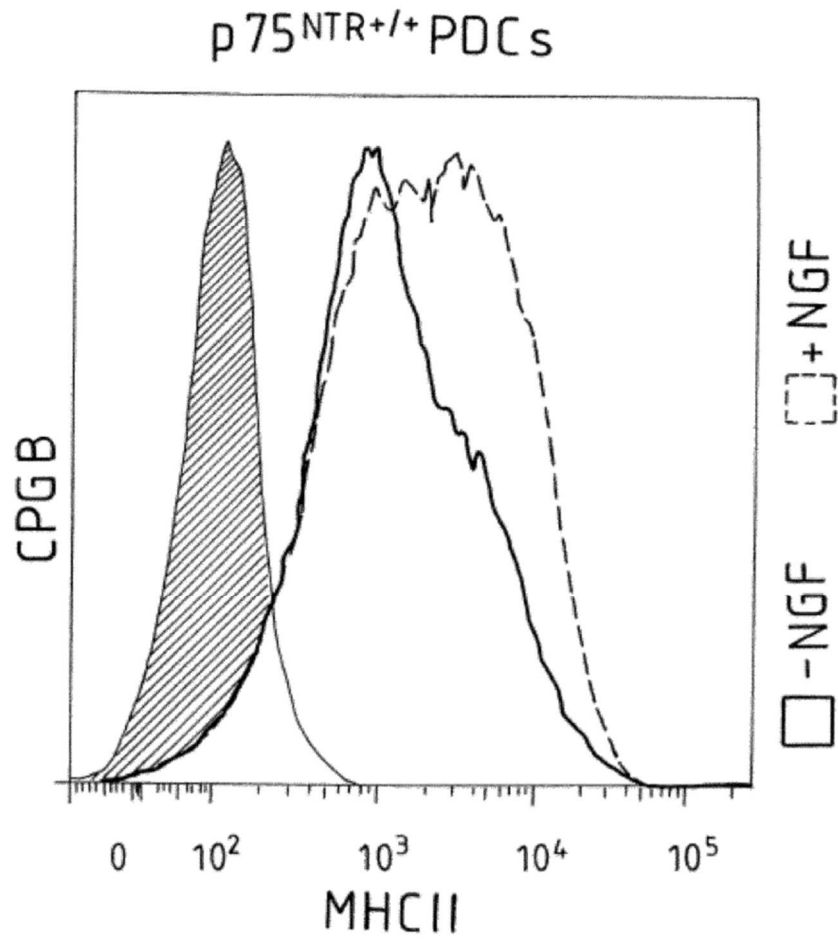


Figura 4c

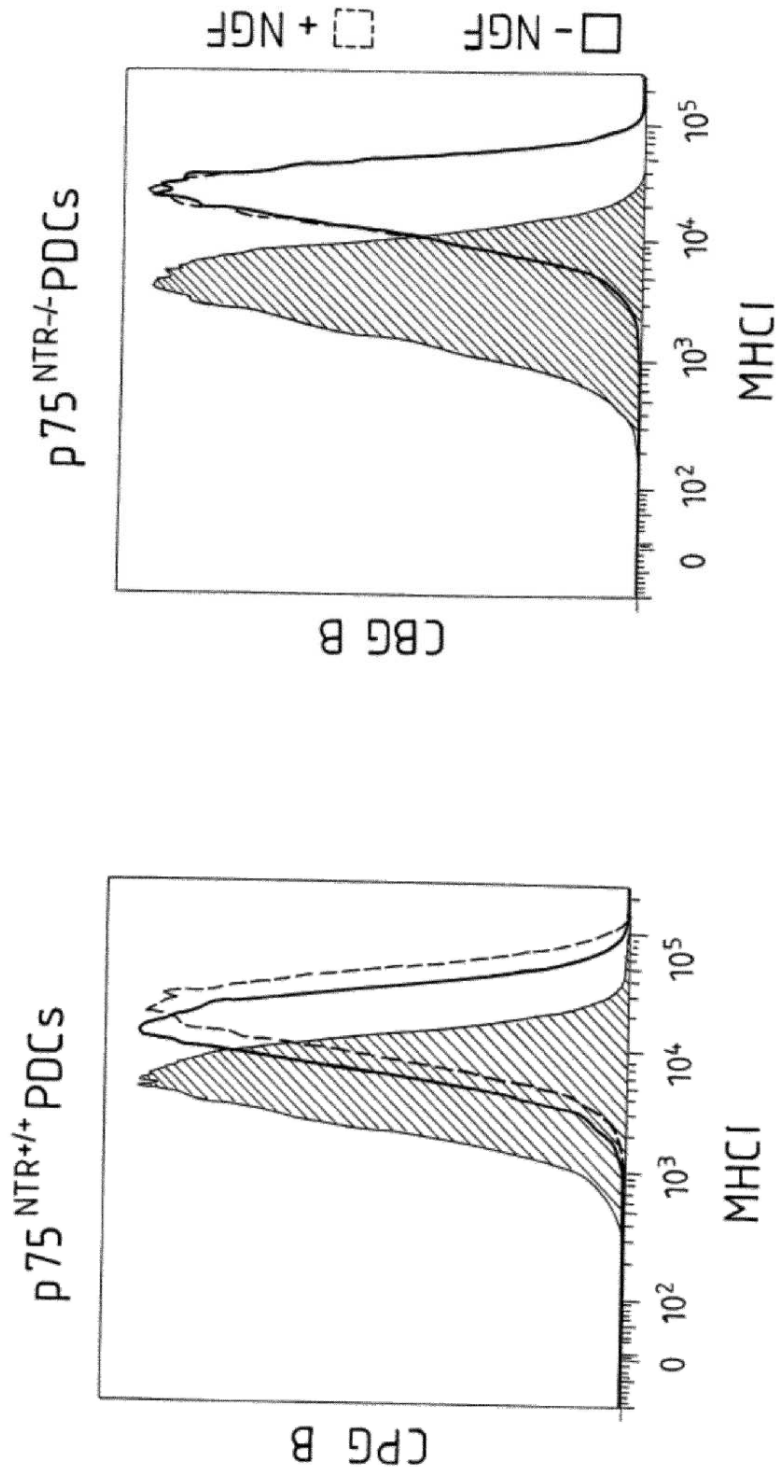


Figura 5a

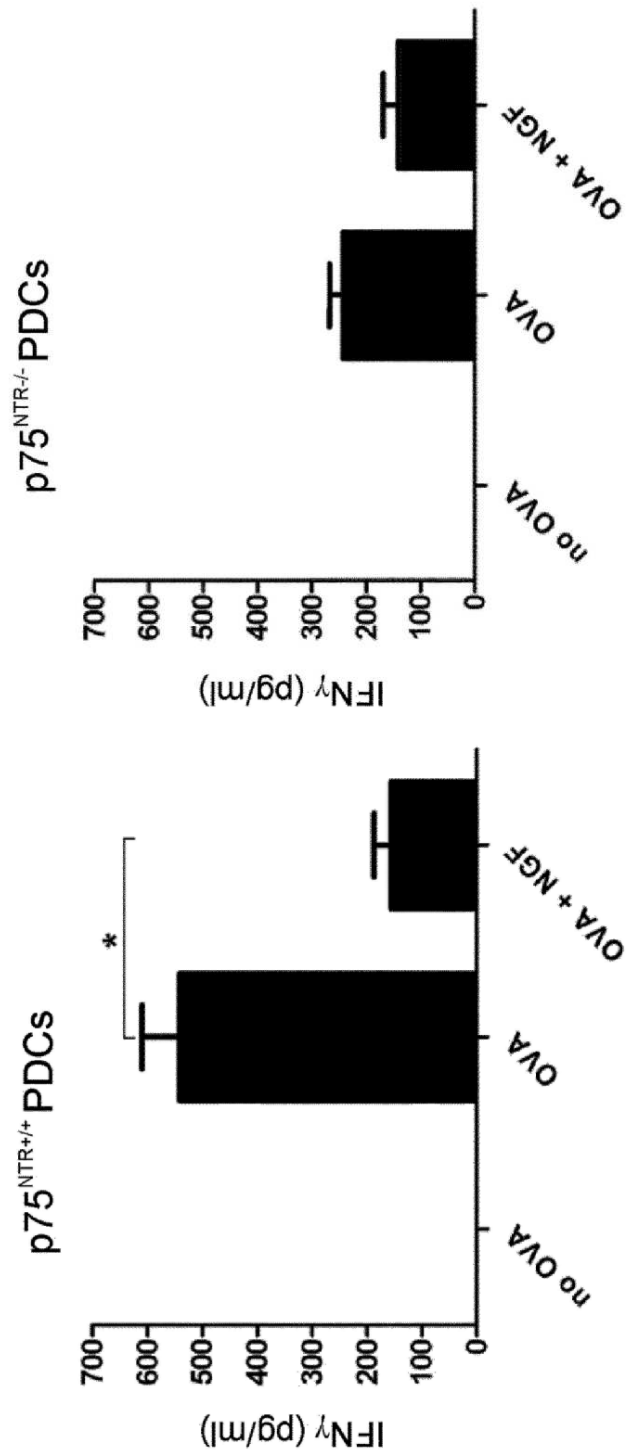


Figura 5b

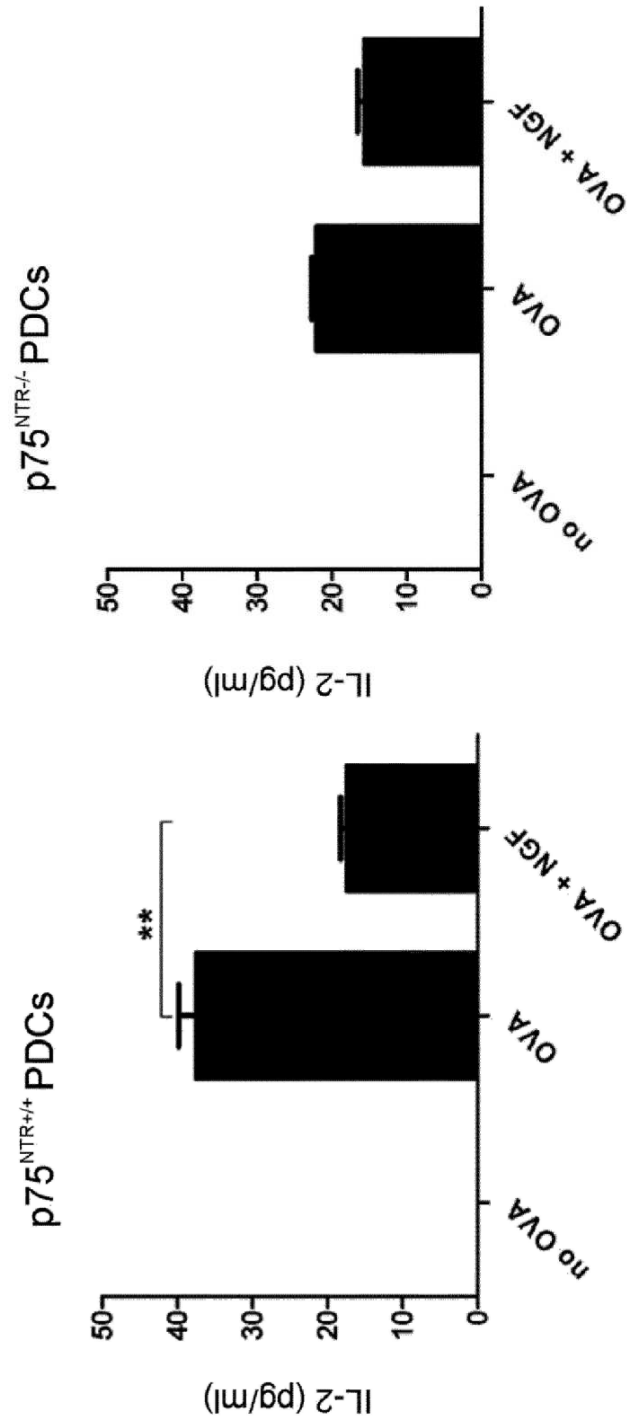


Figura 6a

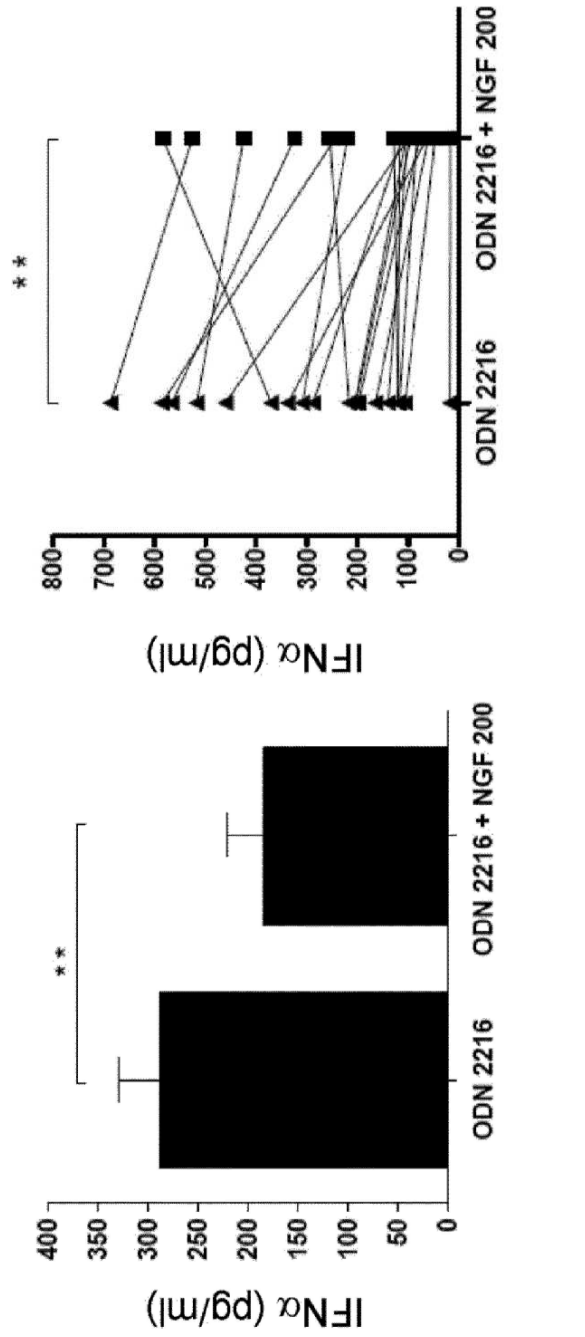


Figura 6b

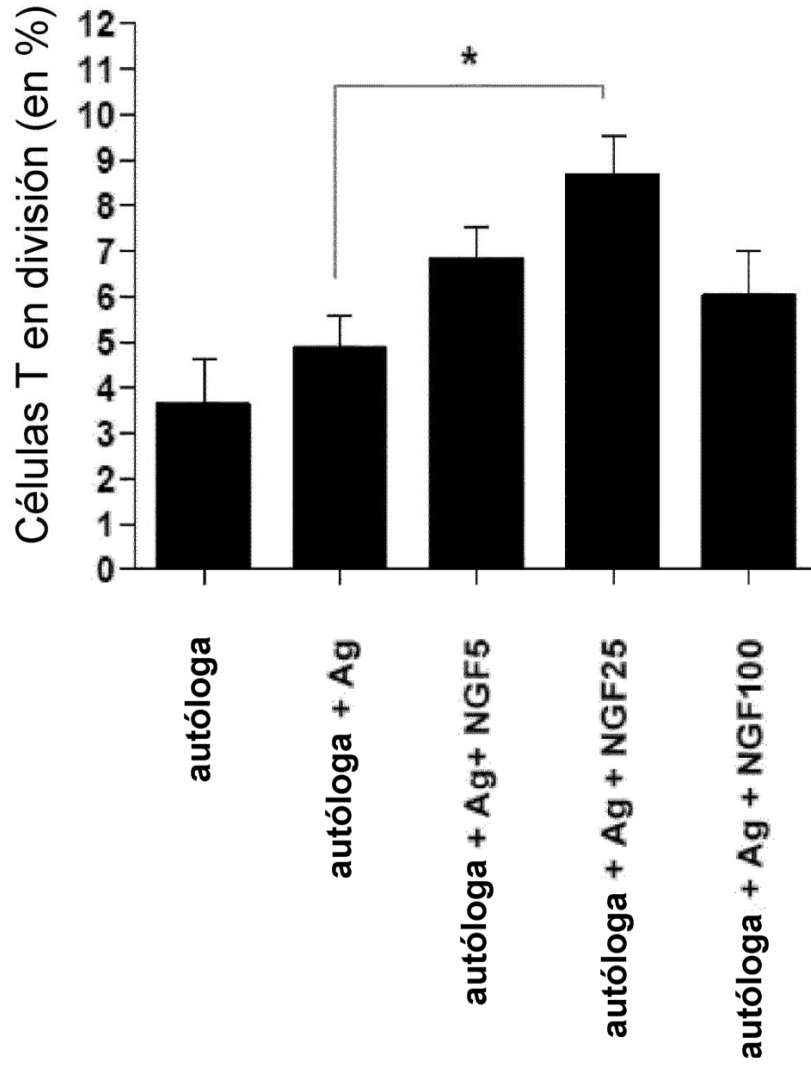


Figura 7a

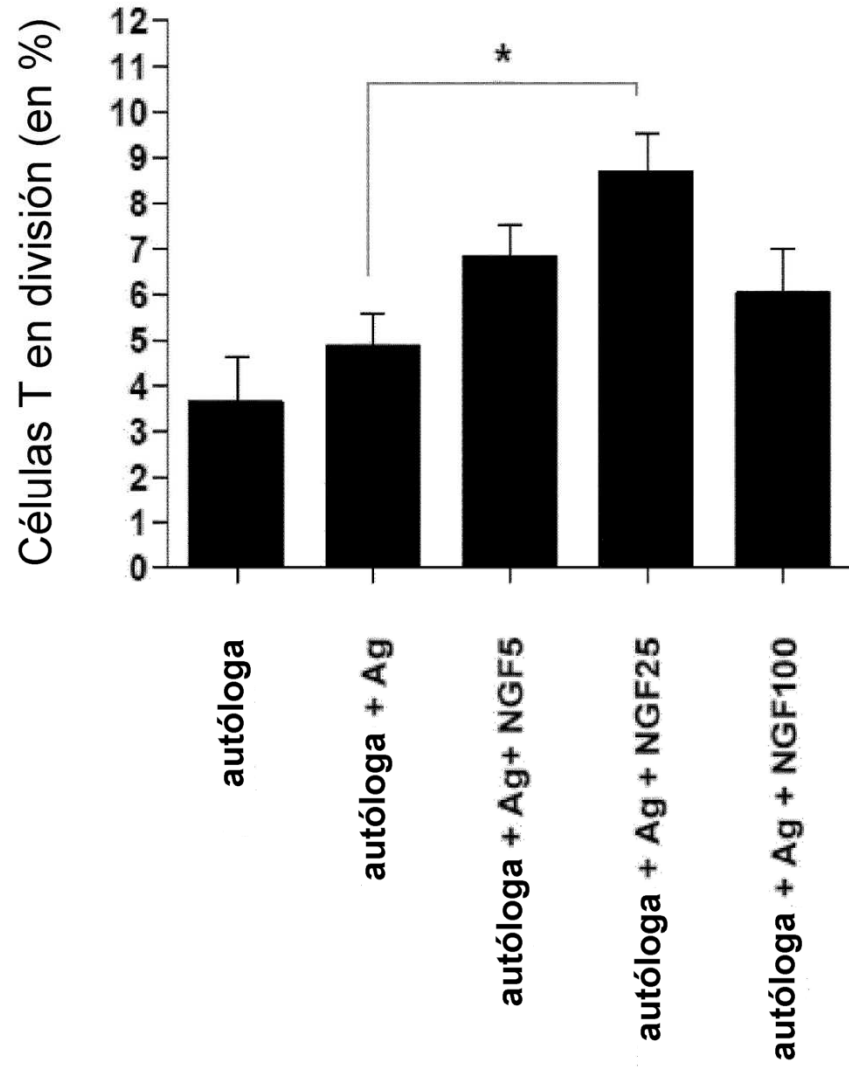


Figura 7b

