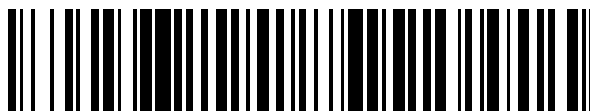


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 100**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2012 PCT/IT2012/000018**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012 WO12101664**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2012 E 12714046 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2667895**

54 Título: **Uso de al menos un inhibidor del receptor p75NTR, solo o en asociación con al menos un activador del receptor TrkA, o de al menos un activador del receptor TrkA, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas**

30 Prioridad:

**24.01.2011 IT RM20110024**

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

**30.10.2019**

73 Titular/es:

**OSPEDALE PEDIATRICO BAMBINO GESÙ  
(50.0%)**

**Piazza S.Onofrio 4  
00165 Roma, IT y**

**CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BRACCI LAUDIERO, LUISA y  
DE BENEDETTI, FABRIZIO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

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

ES 2 729 100 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

Uso de al menos un inhibidor del receptor p75NTR, solo o en asociación con al menos un activador del receptor TrkA, o de al menos un activador del receptor TrkA, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas

5 La presente invención se refiere al uso de al menos un inhibidor del receptor p75NTR, solo o en asociación con al menos un activador del receptor TrkA, o al menos un activador del receptor TrkA, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. En particular, la invención se refiere al uso de inhibidores (antagonistas) del receptor p75NTR y/o de activadores (agonistas) del receptor TrkA, como, por ejemplo, el NGF, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas de origen autoinmunitario o autoinflamatorio como, por ejemplo, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedad de Crohn, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico.

15 Las enfermedades inflamatorias crónicas son un grupo de enfermedades caracterizadas por una inflamación crónica que conduce a daños en los tejidos y pérdida de la función del tejido diana. Las causas de estas enfermedades no se conocen en detalle. Las terapias actuales se basan en el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, fármacos basados en cortisona e inmunosupresores. Los tratamientos son eficaces solo para un bajo porcentaje de pacientes y están cargados de efectos secundarios. Más recientemente, la introducción de algunos fármacos biológicos ha mejorado los porcentajes de respuesta. Sin embargo, es evidente que un porcentaje notable de pacientes que padecen enfermedades inflamatorias crónicas no muestra una respuesta clínica satisfactoria y también estos fármacos están cargados de efectos secundarios tanto a corto como a largo plazo.

A la luz de lo anterior, por lo tanto, es evidente la necesidad de proporcionar nuevas terapias para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias crónicas adecuadas para superar las desventajas de la técnica conocida.

25 Durante los últimos años se informan muchos datos que demuestran el papel de los receptores tipo Toll (TLR, de sus siglas in inglés) en la aparición de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. La regulación incorrecta de las vías de señalización asociadas a receptores tipo Toll da como resultado un aumento de la síntesis de citocinas y quimiocinas inflamatorias que, en asociación con alteraciones en los mecanismos antiinflamatorios endógenos, da lugar a un proceso inflamatorio crónico (1). Entre las células que muestran un papel clave en el proceso inflamatorio hay monocitos que expresan TLR en la membrana y que, debido a estos receptores, son adecuados para reconocer "señales de peligro" exógenas (patógenas) y endógenas y activar las vías de señalización intracelulares que regulan la síntesis de citocinas inflamatorias. El tipo y la cantidad de citocinas liberadas por los monocitos como resultado de la "señal de peligro" reconocida por los TLR determinan la calidad de la respuesta, lo que afecta la migración, la diferenciación y el estado funcional de las células inmunitarias naturales, y regulan la presentación del antígeno y el linfocito T indiferenciado diferenciando el destino en varios linajes efectores o reguladores.

35 Por lo tanto, tanto la regulación de la síntesis como el tipo de citocinas liberadas como respuesta a un estímulo inflamatorio representan un mecanismo clave en la inflamación que, si no se controla de manera oportuna, da como resultado daño tisular y el inicio de patologías inflamatorias crónicas.

40 Entre los factores liberados en el sitio de la inflamación durante la respuesta inflamatoria existe el factor de crecimiento nervioso (NGF, de sus siglas in inglés). La producción basal del NGF que se produce en tejidos humanos aumenta considerablemente en los tejidos inflamados como resultado de diversas enfermedades inflamatorias crónicas y/o autoinmunitarias: las concentraciones elevadas del NGF parecen estar correlacionadas con el grado de inflamación y la actividad clínica en pacientes con enfermedades crónicas inflamatorias como, por ejemplo, esclerosis múltiple (MS, de sus siglas in inglés), artritis reumatoide (RA, de sus siglas in inglés), lupus eritematoso sistémico (SLE, de sus siglas in inglés), enfermedad de Crohn (CD, de sus siglas in inglés), colitis, psoriasis, dermatitis atópica (para una revisión reciente véase la ref. 2).

50 El aumento local del NGF parece estar correlacionado con la aparición de citocinas inflamatorias. Estudios *in vitro* han demostrado que las citocinas inflamatorias como Interleucina-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), inducen la síntesis del NGF en varios tipos de células como sinoviocitos, fibroblastos, células endoteliales y gliales. También las células inmunitarias involucradas en la inmunidad natural tienen una síntesis basal del NGF que aumenta después de la estimulación con citocinas o antígenos específicos (2). Estos datos, obtenidos en su mayoría *in vitro*, demuestran que la inducción de la síntesis del NGF podría ser correlacionable con el grado del fenómeno inflamatorio y ha conducido a la hipótesis de una actividad proinflamatoria de dicha neurotrofina.

60 Esta interpretación aparentemente contrasta con la referencia a experimentos *in vivo* que demuestran que, para enfermedades inflamatorias en modelos animales, la administración exógena del NGF, después de la inducción de la enfermedad, reduce la aparición y la gravedad de los síntomas clínicos, así como la inflamación tisular en modelos animales para esclerosis múltiple, colitis e irradiación UV.

65 La administración intraventricular del NGF exógeno, una semana después de la inducción de la encefalomiелitis autoinmunitaria (EAE) retrasa la aparición de la enfermedad en monos tíes, reduciendo el número y la gravedad de las lesiones. En el cerebro de los animales tratados con el NGF, el número y el tamaño de los infiltrados inflamatorios

se reducen, la desmielinización es mínima, la producción de IFN- $\gamma$  disminuye mientras que la de IL-10 aumenta (3). Este efecto del NGF en la respuesta inflamatoria para EAE también se ha observado en modelos murinos obtenidos con varios métodos para la inducción de la enfermedad y en donde las inyecciones intraperitoneales del NGF retrasan la aparición de la enfermedad, disminuyen los síntomas clínicos y aumentan la supervivencia de los animales (4,5).  
 5 Como una confirmación ulterior de estos resultados, la neutralización del NGF obtenido con el tratamiento con anticuerpos anti-NGF agrava los síntomas de EAE y aumenta el número de lesiones inflamatorias cerebrales (6).

La posibilidad de que el NGF pueda estar involucrado en la vía antiinflamatoria *in vivo* también está respaldada por estudios en modelos murinos de inflamación aguda como colitis inducida por ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) e irradiación de la piel utilizando UVB. Para la epidermis del ratón, la radiación UVB da como resultado un aumento del NGF que alcanza el valor máximo después de 12 horas (7). Si el NGF endógeno se neutraliza con anti-NGF, se induce una respuesta de hipersensibilidad de contacto (respuestas de hipersensibilidad de contacto-CHS) que, por el contrario, normalmente es inhibida por UVB. De manera similar, la administración del NGF en ratones normales antes del tratamiento de la piel con trinitroclorobenceno inhibe la respuesta CHS (8).  
 10  
 15

Se obtienen resultados similares en modelos de colitis en donde se muestra que la síntesis del NGF se mantiene elevada hasta que la respuesta inflamatoria (9) no disminuye. La privación del NGF, obtenida en estos modelos con anticuerpos anti-NGF, empeora significativamente el fenómeno inflamatorio, que determina un empeoramiento de los síntomas clínicos, un aumento del número de lesiones inflamatorias caracterizadas además por un infiltrado más grande de células inflamatorias (10).  
 20

En estos modelos de inflamación aguda, la presencia del NGF, producida durante la respuesta inflamatoria, parece ser necesaria para que la capacidad del organismo de controlar la respuesta inflamatoria se regule y los mecanismos antiinflamatorios que limitan el daño tisular se activen.  
 25

El mecanismo de acción del NGF y los efectos del bloqueo del receptor de NGF en las neuronas sensoriales periféricas están suficientemente caracterizados. De hecho, la neutralización del NGF con anticuerpos anti-NGF o el bloqueo del receptor TrkA se han sugerido como posibles tratamientos farmacológicos para el tratamiento del dolor de origen diverso. Por el contrario, se desconoce cuáles son los mecanismos antiinflamatorios modulados por el NGF, de qué manera esta neurotrofina actúa para su regulación, las razones que conducen a la producción del NGF durante la respuesta inflamatoria y el papel fisiológico de la misma, es decir, es completamente desconocido cuales son los efectos de la inhibición del receptor del NGF en las células inmunitarias implicadas en la respuesta inflamatoria. De hecho, además de las razones desconocidas por las cuales la producción del NGF aumenta durante la inflamación y los mecanismos celulares y moleculares regulados por el NGF durante la respuesta inflamatoria, se desconoce si la expresión de TrkA y p75NTR está modulada durante la inflamación y cuáles son las vías de señalización activadas por estos dos receptores.  
 30  
 35

Las señales intracelulares de TrkA y p75NTR se han investigado casi exclusivamente en células neuronales. En las células neuronales, la actividad del NGF está mediada por la unión del mismo a dos receptores de membrana: TrkA y p75NTR. TrkA es una tirosina cinasa transmembrana de 140 kD que se fosforila en los restos de tirosina cuando se une al NGF. Las principales vías de señalización intracelular activadas por TrkA son Ras, fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3-cinasa), fosfolipasa C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) y sus efectores posteriores, incluida la estimulación a través de Ras de la cascada de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAP), la estimulación de la PI3-cinasa dependiente de Akt y la formación de IP-3 y diacil-glicerol inducida por PLC- $\gamma$ 1, que, a su vez, determinan la movilización del calcio intracelular (11). El otro receptor del NGF, p75NTR, es una glucoproteína de 75 kD que pertenece a la familia de los receptores del TNF. Contrariamente a TrkA, p75NTR no tiene subunidades catalíticas intracelulares pero se une a adaptadores como sortilin, Nogo, RhoGDI, Traf6, etc., activando así las vías de señalización intracelular. Entre las vías de señalización activadas por p75NTR se encuentran: la cascada de señalización activada por la cinasa c-Jun, la activación de NF- $\kappa$ B (JNK), la activación de la esfingomielinasa, la formación de ceramida y la activación de RhoA (11). Las vías de señalización intracelulares activadas por el NGF a través de sus receptores se han estudiado principalmente en células neuronales y hay muy pocos datos disponibles sobre cuáles son las vías de señalización activadas por TrkA y p75NTR. La mayoría de las células inmunitarias expresan TrkA (2) mientras que las dendríticas parecen expresar principalmente p75NTR (12,13). La expresión de TrkA está finamente regulada dentro de los linfocitos y monocitos y aumenta después de la estimulación con un estímulo inflamatorio (2). Los estudios realizados en linfocitos han demostrado que la unión de NGF y TrkA induce la activación de la ruta de la MAP-cinasa (14). Por otro lado, hasta ahora no se sabe qué vías de señalización se activan por el NGF a través de TrkA y p75NTR en las células inmunitarias y de qué manera la activación de las mismas afecta la actividad de las células inmunitarias.  
 40  
 45  
 50  
 55

De hecho, esta información es importante para comprender los mecanismos a través de los cuales el NGF regula la respuesta inflamatoria.  
 60

Hasta ahora, la mayoría de las actividades biológicas del NGF descritas se consideran inducidas mediante la activación de TrkA y las vías de señalización asociadas que regulan la activación o inactivación de los genes controlados por el NGF. Hasta hace unos años, se pensaba que la función de p75NTR, que es una proteína prototipo de la superfamilia del receptor del TNF, era hacer una unión más específica del NGF a TrkA y aumentar la afinidad del mismo, creando receptores heterodiméricos de alta afinidad, es decir, p75NTR-TrkA. Por el contrario, estudios recientes con análisis  
 65

bioquímicos estructurales han demostrado que TrkA y p75-NTR forman homodímeros y no heterodímeros con NGF (15), por lo que la hipótesis emergente es que las mismas son vías de señalización activadas independientemente mediante la unión de NGF con cada uno de los dos receptores para convergir posteriormente y a través de moléculas adaptadoras (16). La actividad biológica del NGF depende, por lo tanto, de una convergencia de señales activadas por cada receptor en lugar de interacciones directas de los dos receptores a nivel de la superficie extracelular.

Se sabe que en las neuronas TrkA y p75NTR controlan varias vías de señalización que conducen a diferentes respuestas intracelulares. Por ejemplo, en el sistema nervioso durante el desarrollo, el NGF puede actuar como factor trófico y apoptótico dependiendo de la prevalencia de las vías de señalización activadas por TrkA (supervivencia) o p75NTR (apoptosis). No hay muchos estudios fuera del sistema nervioso que demuestren las diferentes respuestas que el NGF puede provocar a través de la estimulación selectiva de uno u otro receptor y esta información está completamente ausente para las células inmunitarias y particularmente para los monocitos que desempeñan un papel clave en la inflamación. El único estudio en donde se asume un papel particular para p75NTR es Micera et al., 2007, en donde se demuestra que en los fibroblastos (células conectivas, no inmunitarias, de tejido), obtenidos de la conjuntiva de pacientes alérgicos con queratoconjuntivitis, el bloqueo de p75NTR da como resultado un aumento de la secreción de proteínas del tejido conectivo (17).

Además, el estudio realizado por Barthel et al., 2009 muestra que tanto TrkA como p75NTR se expresan en exceso en tejidos inflamados (39). Sin embargo, cómo TrkA y p75NTR se modulan durante la respuesta inflamatoria, las vías de señalización activadas y cómo estas pueden interferir con la activación de TLR y la síntesis de citocinas inflamatorias es toda información actualmente desconocida.

Contrariamente a la hipótesis prevaleciente de acuerdo con la cual el NGF es un factor inflamatorio, los inventores de la presente invención han basado sus estudios en consideraciones diametralmente opuestas. De hecho, los inventores han asumido que el aumento de la síntesis del NGF, que caracteriza los sitios de inflamación de los modelos animales para la inflamación aguda y los pacientes con inflamación crónica o enfermedades autoinmunitarias, es un mecanismo endógeno activado para modular la respuesta inflamatoria y limitar los daños en los tejidos. La hipótesis de trabajo ha sido, por lo tanto, que la expresión relativa de los dos receptores del NGF es el factor crítico que determina el efecto final del NGF en la respuesta inflamatoria. Como actualmente se conoce solo para las células nerviosas (11) y los fibroblastos (17), dos receptores del NGF, es decir, TrkA y p75NTR, pueden regular diferentes vías de señalización y dar lugar a efectos del NGF aparentemente opuestos (es decir, supervivencia/apoptosis). El objetivo general del presente estudio ha sido, por lo tanto, adquirir nueva información sobre el papel del NGF y los receptores TrkA y p75NTR en la inflamación y cómo la inhibición de cualquiera de los receptores puede modular la respuesta inflamatoria.

Los inventores de la presente invención han encontrado ahora, por medio de estudios en monocitos humanos, que la unión del NGF a TrkA y p75NTR se activa independientemente entre sí por vías de señalización y es adecuada para modular las señales intracelulares de los TLR activados por estímulos inflamatorios, controlando, de hecho, la producción de citocinas inflamatorias. Los datos demuestran por primera vez que el NGF puede actuar en la misma célula de maneras opuestas, dependiendo de la prevalencia de uno de los dos receptores. En particular, los inventores, mediante estudios en monocitos, han demostrado que:

- el receptor TrkA tiene un papel antiinflamatorio;
- el receptor p75NTR tiene un papel proinflamatorio.

Los datos demuestran, además, que en pacientes afectados por artritis reumatoide o artritis idiopática juvenil, enfermedades inflamatorias crónicas típicas, existe una relación anómala de p75NTR/TrkA, siendo p75NTR mayor favoreciendo así la señal proinflamatoria del NGF mediada por p75NTR. Dicha nueva información obtenida por estudios sobre las vías intracelulares activadas por la unión del NGF a TrkA y p75NTR, sobre los efectos de la activación de cualquiera de los receptores del NGF, activación de TLR y síntesis de citocinas permitió identificar al receptor p75NTR como una nueva diana para la terapia de enfermedades inflamatorias crónicas.

Los datos obtenidos *in vitro* utilizando monocitos humanos y las condiciones de cultivo que modulan la expresión de los receptores TrkA y p75NTR cambiando su relación relativa, junto con el uso de anticuerpos neutralizantes, inhibidores farmacológicos p75NTR y algunos intermedios intracelulares, permitieron demostrar por primera vez que:

- a) TrkA y p75NTR controlan diferentes vías intracelulares;
- b) el NGF actúa a través de sus receptores para regular las vías de señalización activadas mediante TLR y modular la síntesis de citocinas en los monocitos que son células que muestran un papel clave en la inflamación y el vínculo crítico entre la inmunidad natural y la adaptativa;
- c) el bloqueo de un receptor de hecho refuerza la actividad del NGF a través del otro receptor y, dado que las vías de señalización controladas son diferentes para dichos dos receptores, la actividad del NGF en la síntesis de citocinas resulta diametralmente opuesta;
- d) la actividad del NGF mediado por p75 es proinflamatoria y el bloqueo de p75NTR con anticuerpos neutralizantes o inhibidores farmacológicos da como resultado una reducción de las citocinas inflamatorias y la prevalencia de las vías antiinflamatorias que, por el contrario, están moduladas por TrkA;

e) las células mononucleadas de pacientes con artritis reumatoide (RA) y artritis idiopática juvenil (JIA, de sus siglas en inglés) tienen una relación de expresión p75NTR/TrkA invertida que las células de individuos sanos, con prevalencia de p75NTR en pacientes con inflamación crónica, mientras que normalmente el principal receptor expresado en sujetos sanos es TrkA;

5 f) los sinoviocitos de pacientes con RA mantienen esta mayor expresión de p75NTR asociada con una producción espontánea de citocinas inflamatorias que se reduce por la inhibición del receptor p75NTR.

10 En conclusión, los datos existentes han señalado un nuevo mecanismo patógeno que muestra una expresión anormal de p75NTR en pacientes con inflamación crónica que, asociado al aumento de la producción del NGF, da como resultado un desequilibrio de vías pro y antiinflamatorias (18) normalmente activadas durante la respuesta inflamatoria. La mayor activación de p75NTR determina una mejora de las vías de señalización proinflamatorias activadas por los TLR (es decir, NF-kb) y una mayor producción de citocinas inflamatorias. Por el contrario, en condiciones normales, NGF señala a través de p75NTR, pero sobre todo a través de TrkA, cuya expresión es inducida enormemente por los estímulos inflamatorios en células mononucleadas de sujetos sanos. Esta expresión alterada de p75NTR en  
15 pacientes con inflamación crónica podría contribuir a la regulación incorrecta de las vías de señalización unidas a los receptores tipo Toll, lo que da como resultado un aumento de la síntesis de citocinas y quimiocinas inflamatorias que, en asociación con alteraciones en mecanismos antiinflamatorios endógenos, podrían, por lo tanto, contribuir a la inflamación crónica.

20 La identificación de este nuevo mecanismo patógeno y los datos obtenidos sobre los efectos de la inhibición de p75NTR en la producción de citocinas inflamatorias en modelos *in vitro* y experimentos *ex vivo* sugieren que p75NTR es una nueva diana terapéutica en la inflamación crónica.

25 A la luz de los resultados descritos en el presente documento, los inhibidores (antagonistas) del receptor p75NTR y los activadores (agonistas) del receptor TrkA representan moléculas útiles para modular la respuesta inflamatoria en enfermedades inflamatorias crónicas en donde la relación receptor TrkA/p75 está alterada.

30 Hasta ahora, los agonistas y antagonistas de los receptores del NGF están concebidos para regular alteraciones neuronales (terapia del dolor, neuropatías y similares) o la supervivencia de las neuronas (enfermedad de Alzheimer) basándose en mecanismos conocidos y bien descritos que implican al NGF dentro de las neuronas. El artículo de Petersen et al., 1998, por ejemplo, se refiere a un estudio *in vitro* realizado sobre neuronas sensoriales y sugiere un papel del NGF en la activación del dolor a través del receptor p75NTR. En particular, se trata de un estudio *in vitro* que muestra que el NGF aumenta la expresión de los sitios de unión a la bradicinina en las neuronas a través de p75NTR, siendo la bradicinina una de las sustancias endógenas más poderosas que producen dolor que se libera después de  
35 una lesión tisular. Los autores prevén que la interferencia con los mecanismos de señalización NGF-p75NTR puede revelar nuevas estrategias de tratamiento para los estados de dolor inflamatorio crónico.

40 Actualmente, dos anticuerpos monoclonales, NGF o TrkA, respectivamente neutralizantes, se encuentran en la experimentación clínica inicial para la terapia del dolor en neuropatías.

Además, en la literatura científica se describen algunos compuestos sintetizados y utilizados para inhibir la unión de NGF y p75NTR o TrkA en experimentos *in vivo* e *in vitro* (19-37). El uso de los mismos se concreta en enfermedades neurodegenerativas. Actualmente se han descrito los siguientes compuestos:

- 45 - Anticuerpos monoclonales neutralizantes y anticuerpos quiméricos o receptores solubles, como los ya utilizados en experimentos llevados a cabo en el laboratorio y como el anticuerpo monoclonal humanizado MNAC13 contra TrkA, ahora BXL1H5 (Bioxell); anticuerpo monoclonal que bloquea la unión de NGF-TrkA, tanezumab, anteriormente conocido como RN624 (Pfizer); receptor soluble TrkAD5 (dominio de unión de TrkA-NGF soluble, conocido anteriormente como REN 1820); anticuerpo monoclonal 5C3 TrkA agonista (37); anticuerpo monoclonal neutralizante anti-p75NTR ME20.4; anticuerpos monoclonales MLR-1, MLR2, MLR3 que neutralizan p75NTR; anticuerpo anti-p75NTR humano clon HB-8737, anticuerpo policlonal neutralizante anti-p75NTR (REX).
- 50 - compuestos monoméricos y diméricos cíclicos análogos a NGF que se unen a p75NTR, como NGF C30-35, o que se unen a TrkA, como NGF C92-97, evitando la unión de NGF (19-23) o actuando como agonistas de TrkA como D3 (25) o NGF recombinante mutado como NGF KKE/7-84-103 (26,27).
- 55 - el compuesto PD90780 que se une al NGF impidiendo la unión del mismo a p75NTR influyendo parcialmente también en la unión con TrkA (28-30); amida gámbogica, molécula pequeña que imita la actividad del NGF y representa un nuevo agonista de TrkA selectivo (31).
- 60 - los compuestos que pertenecen a la familia LM11A y entre estos LM11A-24 y LM11A-31 procedentes de la cafeína y la isoleucina, respectivamente. Dichos compuestos consisten en moléculas pequeñas no peptídicas que se unen a p75NTR en el sitio de unión específico a NGF, inhibiendo selectivamente la capacidad de p75NTR para unirse a NGF pero sin interferir de ninguna manera en la unión de NGF y TrkA (33-36);
- 65 - moléculas no peptídicas de bajo peso molecular que comprenden 3-aza-biciclo [3,2,1] octano y derivados monoméricos y diméricos del mismo que se unen a TrkA pero no a p75NTR y que actúan como agonistas de la neurotrofina humana (Patente de Estados Unidos 7625892).

Los datos informados anteriormente demuestran que los antagonistas de p75NTR, que son anticuerpos monoclonales neutralizantes, quimeras o antagonistas como moléculas no peptídicas LM11A, solos o en asociación con el NGF o agonistas de TrkA, activan las vías intracelulares que inhiben la respuesta inflamatoria, lo que da como resultado una reducción de la producción de citocinas inflamatorias y un aumento de la producción de citocinas antiinflamatorias.

5 Se han obtenido resultados superpuestos mediante el bloqueo de p75NTR con varias sustancias utilizando diferentes mecanismos de inhibición:

- 10 a) anticuerpos neutralizantes, que a través de la unión al receptor evitan la unión de NGF y p75NTR pero no interfieren con la unión de NGF y TrkA  
 b) receptor p75NTR soluble (molécula recombinante quimérica que consiste en una secuencia de aminoácidos de la región extracelular del receptor p75NTR humano fusionada a una región Fc de una IgG humana) que se une al sitio de unión específico del NGF que reconoce el NGF de origen soluble con p75NTR que es diferente al TrkA.  
 15 c) moléculas del tipo LM11A-24 LM11A-28, LM11A-31, procedentes de la cafeína o isoleucina que son moléculas no peptídicas, miméticas del dominio del bucle 1 de la neurotrofina y, por lo tanto, ocupan el sitio de unión del NGF a p75NTR evitando que el NGF interactúe con p75NTR que se une, por lo tanto, solo a TrkA.

Independientemente del tipo de inhibición utilizada, los efectos del bloqueo de p75NTR, como se ilustra a continuación, dan como resultado siempre una reducción de la síntesis de citocinas inflamatorias y un aumento de las citocinas antiinflamatorias, y demuestran de manera inequívoca el potencial terapéutico del bloqueo de p75NTR.

Por lo tanto, es un objeto específico de la presente invención un compuesto (o más compuestos) seleccionado de inhibidores del receptor p75NTR (o antagonistas), solo o en asociación con al menos un compuesto seleccionado de activadores del receptor TrkA (o agonistas), o un compuesto seleccionado de activadores del receptor TrkA, para su uso en el tratamiento antiinflamatorio de enfermedades inflamatorias crónicas de origen autoinflamatorio o autoinmunitario, con exclusión de enfermedades de origen alérgico, en pacientes en los que la relación de expresión receptor TrkA/receptor p75NTR es inferior a 1 en tejidos inflamados o células de fluidos biológicos; en donde los compuestos inhibidores (antagonistas) del receptor p75NTR se pueden seleccionar del grupo que consiste en anticuerpos policlonales y monoclonales, monoespecíficos o biespecíficos, de unión a p75NTR, moléculas quiméricas cuya estructura incluye p75NTR soluble, compuestos análogos a NGF cíclicos monoméricos y diméricos de unión a p75NTR y en los que los activadores (agonistas) del receptor TrkA se pueden seleccionar del grupo que consiste en anticuerpos policlonales y monoclonales de unión a TrkA como el anticuerpo monoclonal 5C3 (49), compuestos análogos a NGF cíclicos monoméricos y diméricos como NGF C92-97 o NGF recombinante mutado, por ejemplo, bucle 1 mutado y, por lo tanto, no se une al receptor p75NTR, como NGFKE/7-84-103, péptido D3, amida gambógica y derivados de 3-aza-biciclo [3,2,1] octano (Documento US 7.625.892).

Los anticuerpos monoclonales de unión a p75NTR se pueden seleccionar del grupo que consiste en el anticuerpo neutralizante monoclonal anti receptor p75 del factor de crecimiento nervioso humano, clon ME20.4 de Chemicon; anticuerpos monoclonales MLR-1, MLR2, MLR3, anticuerpo anti-p75NTR humano clon HB-8737 (ATCC). El receptor p75NTR soluble, que es una molécula quimérica que consiste en una secuencia de aminoácidos de la región extracelular del receptor p75NTR humano fusionada con la región Fc de una IgG humana, puede ser, por ejemplo, quimera recombinante NGFR/TNFRSF16/Fc humana de R&D Systems.

El anticuerpo policlonal de unión a p75NTR puede ser, por ejemplo, un anticuerpo policlonal neutralizante anti-p75NTR (REX) o anticuerpos policlonales de conejo 9651 y 9650 que reconocen el dominio extracelular de p75NTR. Los compuestos análogos a NGF cíclicos monoméricos y diméricos de unión a p75NTR se pueden seleccionar entre NGF C30-35, compuesto PD90780, compuestos LM11A.

Los compuestos LM11A se pueden seleccionar del grupo que consiste en derivados de cafeína LM11A-24 o derivados de isoleucina LM11A-31. Las enfermedades inflamatorias crónicas que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedades inflamatorias crónicas intestinales (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa) espondilitis anquilosante, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, esclerodermia, síndrome de Sjogren. Las enfermedades de origen alérgico no están incluidas.

Es un objeto adicional de la presente invención una combinación de al menos un compuesto inhibidor del receptor p75NTR con al menos un activador del receptor TrkA, tal como NGF, para el uso separado o secuencial en el tratamiento antiinflamatorio de enfermedades inflamatorias crónicas de origen autoinflamatorio o autoinmunitario, con exclusión de enfermedades de origen alérgico, en pacientes en los que la relación de expresión receptor TrkA/receptor p75NTR es inferior a 1 en tejidos inflamados o células de fluidos biológicos; en donde los compuestos inhibidores (antagonistas) del receptor p75NTR se pueden seleccionar del grupo que consiste en la unión de p75NTR, anticuerpos policlonales y monoclonales, monoespecíficos o biespecíficos, moléculas quiméricas cuya estructura incluye p75NTR soluble, compuestos análogos a NGF cíclicos monoméricos y diméricos de unión a p75NTR y en los que los activadores (agonistas) del receptor TrkA se pueden seleccionar del grupo que consiste en anticuerpos policlonales y monoclonales de unión a TrkA, compuestos análogos a NGF cíclicos monoméricos o diméricos o NGF recombinantes mutados.

Las enfermedades inflamatorias crónicas que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedades inflamatorias crónicas intestinales (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), espondilitis anquilosante, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, esclerodermia, síndrome de Sjogren.

Además, basándose en los datos experimentales obtenidos por los inventores de la presente invención, es posible suponer que, para pacientes afectados por enfermedades inflamatorias crónicas de origen autoinflamatorio o autoinmunitario, con exclusión de enfermedades de origen alérgico, una relación de expresión de receptores TrkA y p75NTR inferior a 1 pueden predecir la respuesta al tratamiento con inhibidores de p75NTR solos o en asociación con agonistas de TrkA o terapias utilizadas actualmente. Por lo tanto, la evaluación de dicha relación podría emplearse para un método de diagnóstico *in vitro* con el fin de estimar la posibilidad de respuesta a la terapia. En particular, el método podría basarse en la determinación cuantitativa de los niveles de ARNm para p75NTR y TrkA estimados en biopsias de tejidos inflamados como, por ejemplo, cápsula sinovial, piel, riñón, intestino, o células obtenidas de fluidos biológicos, por ejemplo, sangre, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, saliva.

Un objeto adicional de la presente invención es un método de detección *in vitro* o *ex vivo* para estimar el efecto antiinflamatorio de los inhibidores del receptor p75NTR en enfermedades inflamatorias crónicas de origen autoinflamatorio o autoinmunitario, con exclusión de enfermedades de origen alérgico, directamente en muestras biológicas, como, por ejemplo, tejidos aislados o células mononucleadas de un paciente, comprendiendo o consistiendo dicho método las siguientes etapas: a) poner en contacto tejidos aislados o células mononucleadas de un paciente afectado por una enfermedad inflamatoria crónica con dicho inhibidor (antagonista); b) medir los niveles de citocinas proinflamatorias, como, por ejemplo, IL-1, IL-6 y TNF, liberadas espontáneamente o después de la estimulación con ligandos TLR, en donde dichas enfermedades inflamatorias crónicas se seleccionan del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedades inflamatorias crónicas intestinales (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), espondilitis anquilosante, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, esclerodermia, síndrome de Sjogren. El modelo utiliza monocitos o células mononucleadas de sangre periférica o sinoviocitos de la cápsula sinovial o fibroblastos de células epiteliales de la piel o intestinales y evalúa la posible disminución de la producción de citocinas inflamatorias y la inducción de citocinas antiinflamatorias antes y después del tratamiento de las células con inhibidores de p75NTR y/o activadores de TrkA.

La presente invención se describirá ahora de una manera ilustrativa de acuerdo con las realizaciones preferidas de la misma, con referencia particular a los dibujos adjuntos en donde:

Figura 1: los monocitos humanos estimulados con ligandos TLR4 (A) y TLR2 (B) aumentan la expresión de TrkA durante las siguientes horas, mientras que la expresión de p75NTR es más estable a lo largo del tiempo.

Figura 2: los monocitos de sangre periférica (t0) purificados expresan tanto TrkA como p75NTR, expresándose TrkA en cantidades mayores. Después de 24 horas sin estimulación (Us), la expresión de TrkA y p75, según lo estimado mediante PCR en tiempo real, disminuye mientras que la estimulación de TLR con LPS induce un aumento significativo de la expresión de TrkA (LPS).

Figura 3: Transferencia de Western de TrkA después de 24 y 48 horas de estimulación con ligandos TLR. Mientras que en condiciones no estimulantes (Us) hay una expresión muy baja de TrkA, después de la activación de TLR4 y TLR2 con LPS y LTA o PMA, respectivamente, se observa un aumento de TrkA después de 24 horas y duradero también después de 48 horas.

Figura 4: fosforilación de los receptores TrkA en monocitos después de la unión del NGF. En los monocitos estimulados con LPS, la adición del NGF exógeno induce una autofosforilación del receptor que es inhibida eficazmente por los anticuerpos anti-TrkA.

Figura 5: La adición del inhibidor que evita que el NGF se una a la unión de p75NTR no cambia el nivel de fosforilación de TrkA inducida por la adición (administración) del NGF a monocitos activados por LPS. Aunque p75NTR no puede unirse al NGF, la capacidad del NGF para fosforilar TrkA no se ve afectada.

Figura 6: Expresión de receptores del NGF después de 24 horas de cultivo. Los niveles de expresión de TrkA y p75NTR se analizan solo en monocitos purificados (t0), después de 24 horas de incubación en medios sin estímulos o medios con NGF.

Figura 7: En las células tratadas con NGF durante 16 horas y con una mayor expresión de p75NTR, la estimulación con LPS induce una mayor fosforilación de IκB que las células tratadas solo con LPS. Las células no estimuladas (us) no muestran fosforilación de IκB.

Figura 8: El NGF influye en las vías intracelulares TLR activadas. Cuando TrkA se expresa en mayor cantidad, en las células estimuladas con LPS o LTA, la adición del NGF aumenta la activación de la fosforilación de AKT (A) y también afecta a la inhibición de la fosforilación de GSK3 (B). Además de esta activación de las vías antiinflamatorias, el NGF afecta en consecuencia a la fosforilación de IκB, lo que la reduce (C) y, por lo tanto, también reduce la translocación de NF-κB en el núcleo (D-E). En las figuras D-E, la fluorescencia verde es específica para NF-κB p65, el color azul representa el núcleo y el color blanco indica el NF-κB p65 traducido en el núcleo.

Figura 9: El NGF reduce la producción de citocinas inflamatorias en monocitos que expresan niveles elevados de TrkA. En células activadas con LPS o LTA que induce un aumento de la expresión de TrkA, la adición del NGF disminuye la producción de IL-6 (A), IL-1 b (B) e IL-8 (C) en los monocitos. En células no estimuladas (US), el NGF

no induce la síntesis de citocinas como tal. El efecto de inhibición del mismo sobre la liberación de citocinas inflamatorias es dependiente de la dosis (D).

Figura 10: El NGF aumenta la producción de citocinas antiinflamatorias en monocitos que expresan niveles elevados de TrkA. En células activadas con LPS o LTA que induce un aumento de la expresión de TrkA, la adición del NGF aumenta la síntesis de IL-10 (A), IL-1ra (B) en monocitos.

Figura 11: El NGF aumenta la producción de citocinas inflamatorias en monocitos que expresan niveles elevados de p75NTR. En células activadas con LPS, LTA o PAM en monocitos que tienen una expresión elevada de p75NTR, la adición del NGF aumenta la producción de IL-6 (A), IL-1 b (B) en monocitos. En células no estimuladas (US), el NGF no induce la síntesis de citocinas como tal.

Figura 12: La inhibición de TrkA bloquea la actividad antiinflamatoria del NGF. En las células activadas por LPS, la inhibición de TrkA, tanto con anticuerpos neutralizantes (aTrkA) como con el receptor soluble (chTrkA), da como resultado una disminución de la fosforilación de AKT y la inhibición de la fosforilación de GSK3 (Fig. 12a), aumento de la fosforilación de IκB (Fig. 12b), translocación nuclear de NF-κB (Fig. 12c), producción de IL-6 (Fig. 12D) y reducción de IL-10 (Fig. 12E). En la Figura C, la fluorescencia verde es específica para NF-κB p65, el color azul representa el núcleo y el color blanco indica el NF-κB p65 translocado en el núcleo.

Figura 13: La inhibición de p75NTR reduce la vía inflamatoria inducida por TLR. El anticuerpo monoclonal (ap75) o la quimera p75NTR (chp75) o las moléculas miméticas LM11A (i24, i28, i31) disminuyen la síntesis de IL-6 en monocitos activados con LPS (Fig. 13 ab), aumentan la síntesis de IL-10 (Fig. 13c). Esta regulación se produce a través de la activación de la vía PI3K/AKT y la inhibición de la fosforilación de GSK3 (Figura 13d).

Figura 14: Expresión de TrkA en pacientes afectados por inflamación crónica. La expresión de p75NTR está muy aumentada en las células mononucleares obtenidas de líquidos sinoviales (JIA Syn-MNC) y en sangre periférica (JIA-PBMC) de pacientes afectados por artritis idiopática juvenil, mientras que la expresión de TrkA se reduce significativamente en comparación con los controles sanos (ctrl) (Fig. 14a). Un aumento aún más evidente de p75NTR y una disminución de TrkA caracterizan el líquido sinovial de los pacientes afectados por artritis reumatoide (TrkA RA; p75 RA)(Fig. 14b).

Figura 15: Los sinoviocitos humanos de pacientes que padecen artritis reumatoide *ex vivo* reducen la producción de citocinas inflamatorias después del tratamiento con inhibidores de p75NTR. La expresión de p75NTR es alta y mayor que TrkA en los sinoviocitos obtenidos del líquido sinovial de pacientes afectados por artritis reumatoide (Fig. 15a). La adición *in vitro* del inhibidor de p75NTR reduce la síntesis espontánea de IL-6 en células de pacientes (Fig. 15b).

La figura 16 muestra la fórmula del compuesto PD90780. La figura 17 muestra las fórmulas de los compuestos LM11A-7, LM11A-28, LM11A-31, LM11A-24, LM11A-36 y D3.

Ejemplo 1: Estudio de la relación entre la expresión de los receptores p75NTR y TrkA y la enfermedad inflamatoria crónica

## MÉTODOS

### Cultivos celulares

En este estudio se han utilizado monocitos humanos obtenidos a partir de capas leucocitarias después de la separación en gradiente Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Upsala, Suecia), la separación en gradiente discontinuo Percoll (Pharmacia, Upsala, Suecia) como describe Sallusto y Lanzavecchia (1994) y la selección inmunomagnética negativa sucesiva (Miltenyi Biotec, Alemania). La pureza celular se estima mediante análisis FACS y la fracción de monocitos positivos para CD14 fue > 95 %. Las células se colocaron en placas a una concentración de  $2 \times 10^6$ /ml en placas de Falcon de 96 o 12 pocillos y se cultivaron a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub> y medio de cultivo consistente en RPMI 1640 (Biowhittaker, Walkersville, MD) que contenía penicilina 50 unidades/ml, estreptomycin 50 µg/ml, L-glutamina 2 mM (todas de Gibco-BRL Life Technology, Gaithersburg MD) y suero bovino fetal (FBS) inactivado al 5 % (HyClone Labs, Logan, Utah). Para estudiar los efectos del NGF cuando prevalece la expresión de TrkA o p75NTR sobre la activación de los receptores tipo Toll y la síntesis de citocinas inflamatorias en monocitos, se identifican dos condiciones de cultivo que permiten modificar la expresión de los receptores de NGF. Bajo la condición de cultivo A, se produce un aumento de la expresión de TrkA y se produce un efecto antiinflamatorio del NGF en presencia de estímulos inflamatorios y activación del TLR. Por otro lado, bajo la condición de cultivo B, se produce un aumento de la expresión de p75NTR, y en presencia de estímulos inflamatorios y activación de TLR se observa un efecto proinflamatorio del NGF.

Condición A): los monocitos purificados humanos se estimularon con ligandos de TLR (LPS 10 ng/ml, LTA 2 µg/ml, AM 100 ng/ml) y al mismo tiempo se añade NGF a concentraciones de 0,1 a 100 ng/ml. Tras la estimulación, el medio condicionado y las células se recolectan en diferentes tiempos de estimulación de 3 horas a 5 días.

Condición B): los monocitos purificados humanos se incuban previamente con 0,1, 1, 10 y 100 ng/ml de NGF durante 16 horas y se estimulan sucesivamente con los siguientes ligandos de TLR: LPS 10 ng/ml, LTA 2 µg/ml, PAM 100 ng/ml. El medio condicionado y las células se recolectan en diferentes tiempos de estimulación de 3 horas a 5 días. En los experimentos de inhibición del receptor, se utilizan anticuerpos neutralizantes del receptor TrkA o p75NTR a diferentes concentraciones de 0,3 a 5 mg/ml; moléculas quiméricas que consisten en el dominio extracelular del receptor humano TrkA o p75NTR fusionado a una región Fc de una IgG humana que actúa como receptor soluble en diferentes concentraciones de 0,1 a 5 µg/ml; se utilizaron moléculas miméticas de LM11A que



se unen a p75NTR en el sitio de unión del bucle 1 del NGF con una mayor afinidad y en diferentes concentraciones de 0,1 a 100 nM.

#### Medición de citocinas mediante ELISA

5 Los medios condicionados se recogieron 18 horas después de la estimulación con ligandos de TLR, se almacenaron a -70 °C y luego se analizaron para determinar las distintas concentraciones de citocinas. Las citocinas humanas IL-6, IL-1ra, IL-1β, IL-8, TNF-α e IL-10 se determinaron en medios condicionados utilizando los kits ELISA DuoSet suministrados por R&D Systems, Mineápolis, MN, siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad de ELISA fue 5,47 pg/ml para IL-6, 39,06 pg/ml para IL-1ra, 7,8 pg/ml para IL-1 β, 31,25 pg/ml para IL-8, 7,8 pg/ml para TNF-α y 15,62 pg/ml para IL-10, respectivamente.

#### Extracción de ARN y análisis de PCR en tiempo real

15 El ARN total se extrajo de 2x10<sup>6</sup> monocitos para cada tipo de tratamiento y en diversos tiempos de incubación utilizando el mini kit RNeasy® (Qiagen GmbH, Alemania), y siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del ARN extraído se miden espectrofotométricamente y se utilizó 1 mg del ARN total para cada muestra para la síntesis de ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc Superscript VILO (Invitrogen, Carlsbad, CA).

#### 20 Análisis de PCR en tiempo real

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para el análisis de la expresión de TrkA, p75-NTR, TLR2, TLR4, IL-6, IL-1 e IL-10 se llevaron a cabo con el Detector de Secuencia ABI PRISM™ 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando el Taqman Master Mix universal (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las expresiones de TrkA, p75-NTR, IL-6, IL-1 e IL-10 se midieron utilizando reactivos de ensayo a demanda de Applied Biosystems (p75-NTR Hs00182120\_m1; IL-6 Hs00985639\_m1; IL-1 Hs00174097\_m1; IL-10 Hs00961622\_m1).

En todos los experimentos cada reacción de PCR se llevó a cabo por duplicado. Todos los valores de expresión obtenidos para cada gen se normalizaron con referencia al gen de mantenimiento, es decir, en estos experimentos, β-actina. (β-actina 4326315E endógena de control humano de TaqMan®, Applied Biosystems, Foster City, CA). La cuantificación relativa se llevó a cabo utilizando el método comparativo C<sub>T</sub> (los niveles de expresión se normalizaron con referencia a la expresión del gen de mantenimiento y se calcularon como 2<sup>-ΔCt</sup>) y los resultados obtenidos se expresan en unidades arbitrarias (UA).

#### 35 Transferencia de Western

Los monocitos se lisaron utilizando tampón RIPA modificado que contiene: Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; NP-40 al 1 %; SDS al 0,1 %; Nadeoxicolato al 0,25 %; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; PMSF 1 mM; 1 μg/ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina; y NaF 25 mM (todos de Sigma). Después de la resolución con SDS-PAGE, las proteínas se transfieren a membranas de nitrocelulosa (Amersham Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido) y se incuban con anticuerpos específicos utilizando procedimientos estándar. Los anticuerpos unidos a la nitrocelulosa se detectaron mediante el método de quimioluminiscencia con ECL (Amersham Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). En estos experimentos, se utilizaron anticuerpos policlonales contra TrkA, fosfoTrkA, Akt, fosfoAkt (Ser 473), GSK3 y fosfoGSK3, todos de señalización celular (Cell Signaling Technology, Danvers, BUT); anticuerpos monoclonales y policlonales contra p65 NF-κB, IκBα fueron de Saint Cruz Biotechnology (Saint Cruz, CA); los anticuerpos monoclonales contra la tubulina fueron de Sigma (Saint Louis, MO).

#### Translocación Nuclear de NFκB

50 Los monocitos se incubaron con ligandos TLR, con o sin adición del NGF e inhibidores de los receptores TrkA y p75-NTR durante 30 minutos. Las células se fijaron durante 20 minutos en formaldehído al 4 % en PBS, se hicieron permeables en metanol frío durante 5 minutos, seguido de una incubación de 20 minutos con BSA al 2 % en PBS para bloquear los sitios no específicos. El estudio confocal se llevó a cabo utilizando un microscopio láser confocal Olympus. La tecnología de adquisición de modo secuencial permite diferenciar las emisiones de varios fluoróforos (azul, verde, rojo, emisor de infrarrojos). La cuantificación de la intensidad nuclear de NF-κB se realizó mediante el programa de análisis de imágenes FVAS2.1 de Olympus. Se seleccionaron los núcleos marcados con colorante DRAQ5 (Biostatus) y se cuantificaron la intensidad media de fluorescencia de NF-κB y el área del núcleo. Se adquirieron al menos 3 campos diferentes para cada condición utilizando un objetivo de inmersión de 60x y 50-100 células cuantificadas para cada condición.

#### 60 Análisis de muestras de pacientes

Se analizaron 21 muestras de líquido sinovial y 14 muestras de sangre periférica de 27 pacientes con artritis idiopática juvenil. Las muestras de pacientes se obtuvieron con el consentimiento informado dentro de un plan para la evaluación de la expresión de genes correlacionados con el curso de artritis juvenil aprobado por el Comité de ética de OPBG el 26/03/2010 de acuerdo con la referencia n.º 81/10.

Las muestras de sangre periférica de 16 individuos sanos se utilizaron como controles. Además, se analizaron 6 muestras de tejido sinovial de pacientes adultos con artritis reumatoide positiva con factor reumatoide.

5 El ARN total se extrajo de muestras de tejido sinovial o células mononucleadas obtenidas después de separaciones en gradiente de Ficoll (Pharmacia) de líquidos sinoviales o sangre del paciente utilizando Trizol y siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del ARN extraído se midieron espectrofotométricamente y se utilizó 1 mg del ARN total para cada muestra para la síntesis de ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc Superscript VILO (Invitrogen, Carlsbad, CA).

10 En experimentos *ex vivo*, se utilizaron células mononucleadas de pacientes con artritis idiopática juvenil o sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoide incubados durante 24 horas con inhibidores de p75NTR con o sin adición del NGF en medio RPMI o FCEM DMEM al 10 %. La liberación espontánea de citocinas inflamatorias o la respuesta a los ligandos de TLR se estimaron en medios condicionados mediante ELISA como se describió anteriormente.

## 15 RESULTADOS

El objetivo del estudio fue comprender de qué manera el aumento de la producción local del NGF, durante el proceso inflamatorio, puede afectar la síntesis de citocinas mediante monocitos/macrófagos (M/M) y el papel desempeñado por los receptores del NGF en esta respuesta. Los datos obtenidos han demostrado la aparición de dos mecanismos diferentes mediante los cuales el NGF actúa sobre la respuesta inflamatoria de los monocitos y depende de la prevalencia de cualquiera de los receptores del NGF. Durante el estudio se identificaron dos condiciones de cultivo que permiten modificar la expresión de los receptores del NGF de acuerdo con la prevalencia de TrkA o p75NTR. Bajo la condición de cultivo A, se produce un aumento de la expresión de TrkA y se produce un efecto antiinflamatorio de NGF en presencia de estímulos inflamatorios y activación del TLR. Por otro lado, bajo la condición de cultivo B, se produce un aumento de la expresión de p75NTR, y en presencia de estímulos inflamatorios y activación de TLR se observa un efecto proinflamatorio del NGF.

### 30 *Análisis de la expresión de receptores del NGF y vías de señalización asociadas.*

Dado que la actividad biológica del NGF está mediada por la unión del mismo a receptores específicos, se estimaron los niveles de expresión de p75NTR y TrkA en monocitos en dos condiciones de cultivo y rutas de administración diferentes informadas anteriormente. En los monocitos existe una expresión basal de TrkA que está modulada por la activación de TLR con ligandos específicos (Fig. 1).

35 TrkA aumenta después de la activación de los TLR como mensajero y como proteína (Fig. 2 y 3). Por el contrario, la expresión de p75NTR permanece bastante estable y no aumenta de manera significativa después de la activación de los TLR (Fig. 1 y 2). Los receptores TrkA, inducidos en los monocitos por la activación de los TLR, son funcionalmente activos y cuando se añade el NGF exógeno, se produce la autofosforilación de TrkA de manera similar a como ocurre en las células neuronales. En los monocitos activados por LPS, el bloqueo de TrkA con anticuerpos TrkA o quimera TrkA reduce drásticamente la fosforilación de TrkA en presencia del NGF, ya que evita que el NGF se una a TrkA (Fig. 4).

45 Por el contrario, el uso de anticuerpos anti-p75NTR o quimera p75NTR da como resultado un aumento de la fosforilación de TrkA cuando se añade el NGF al medio de cultivo. Esto se demuestra de manera independiente en la forma en que se evita la unión de NGF y p75NTR, el NGF se puede unir a TrkA, inducir la fosforilación de restos de tirosina y activar vías de señalización correlacionadas intracelulares. (Fig. 5).

50 Condición de cultivo A): solo los monocitos aislados y quiescentes expresan niveles basales tanto de TrkA como de p75-NTR. TrkA se expresa más alto que p75-NTR (Fig. 1) y la relación  $trkA/p75-NTR$  es aproximadamente 2. La estimulación con ligandos de TLR induce un aumento notable de la expresión de TrkA (Fig. 1) y un bajo aumento de la expresión de p75-NTR, con una relación  $TrkA/p75$  de aproximadamente 4.

55 Condición de cultivo B): los monocitos se incuban previamente durante la noche (con NGF y se observa un aumento de la expresión de p75-NTR y la reducción de la expresión de TrkA (Fig. 6), respectivamente. Consistentemente con esta regulación opuesta de los receptores, también las vías de señalización activadas en dichas dos condiciones son diferentes. Cuando se expresa más p75NTR, la vía de señalización NFκ-B se activa más (Fig. 7), mientras que, en presencia de niveles elevados de TrkA, se activan las vías de señalización reguladas por Akt (Fig. 8a y 8b), que están involucradas en el mecanismo endógeno de inhibición<sup>30</sup> de la inflamación y se inhiben la fosforilación de IκB (Fig. 8c) y la translocación nuclear de NF-κB (Fig. 8d).

### 60 *Efectos del NGF en la síntesis de citocinas.*

Los experimentos se llevan a cabo utilizando dos sistemas experimentales diferentes:

65

Condición A): Estimulación de TLR y adición sucesiva de NGF Los monocitos humanos se estimularon con ligandos de TLR y al mismo tiempo se administra NGF. La adición del NGF durante la estimulación con TLR da como resultado una reducción de la producción de IL-6 (Figura 9a). La adición del anticuerpo neutralizante de NGF junto con el NGF (aNGF + NGF) elimina el efecto del NGF en la inhibición de la síntesis de IL-6 como se puede observar después de la activación de TLR (Fig. 9A), lo que demuestra que el efecto está mediado por NGF. El NGF reduce también la síntesis de otras citocinas inflamatorias tales como IL-1  $\beta$  (Figura 9b), TNF- $\alpha$ , IL-8 (Fig. 9C) y este efecto de inhibición es dependiente de la dosis del NGF (Figura 9d). La adición adicional del NGF da como resultado un aumento de la liberación de la citocina IL-10 antiinflamatoria e IL-1ra, que es un antagonista del receptor de IL-1 (Fig. 10, a, b). También bajo estas condiciones experimentales, el NGF solo no modifica la síntesis de citocinas inflamatorias o antiinflamatorias en monocitos no estimulados.

Condición B): Pre-incubación con NGF y estimulación de TLR sucesiva

Los monocitos humanos purificados se incuban previamente con NGF y se estimulan sucesivamente con ligandos de TLR. Cuando se estimula con TLR2 (con PAM y LTA), TLR4 (con LPS) y TLR5 (con flagelina), se observa un aumento dependiente de la dosis del NGF (fig. 11d) en la expresión y liberación de IL-6 (Figura 11a), IL-1  $\beta$  (Figura 11b), IL-8 (figura 11c). En ausencia de ligandos específicos de TLR, el NGF solo no tiene ningún efecto sobre la expresión o liberación de citocinas en monocitos no estimulados.

*Efectos de la inhibición del receptor del NGF sobre la síntesis de citocinas.*

Para discriminar mejor las diferencias en las vías de señalización activadas por los receptores del NGF, los anticuerpos monoclonales neutralizantes de TrkA (anticuerpo policlonal de cabra obtenido por inmunización con el dominio extracelular de la proteína Trka humana recombinante, R&D Systems) y p75NTR (anticuerpo monoclonal, clon ME20.4, Chemicon) y moléculas recombinantes quiméricas que consisten en un fragmento Fc humano se unieron covalentemente a la porción extracelular del receptor (sintetizado y disponible comercialmente de R&D Systems). Estas moléculas representan, de hecho, receptores solubles adecuados para unirse al NGF, que se producen en el cultivo celular, en los sitios de unión específicos de p75-NTR o TrkA y, por lo tanto, evitan la unión de los mismos con los receptores que se producen en la célula.

Los datos obtenidos confirman los resultados observados en dos condiciones de cultivo diferentes en donde un receptor se expresó en mayor cantidad que el otro y demuestra la capacidad del NGF para actuar de manera opuesta de acuerdo con el tipo de receptor disponible.

En presencia de anticuerpos anti-TrkA o quimeras TrkA, la unión de NGF y TrkA se bloquea y solo es posible la unión de NGF y p75NTR. Mediante el bloqueo de TrkA y la inducción de la activación de TLR con ligandos, la adición de NGF da como resultado una disminución de la fosforilación de AKT y una consiguiente disminución de la inhibición de la fosforilación de GSK3 (Fig. 12a), un aumento de la fosforilación de I $\kappa$ B (Fig. 12b) y una mayor translocación nuclear de NF- $\kappa$ B (Fig. 12c), un aumento en la síntesis de citocinas inflamatorias (Fig. 12D) y una reducción de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Fig. 12E). Por el contrario, mediante el bloqueo de la unión de NGF con p75NTR por el anticuerpo monoclonal o quimera o compuestos LM11A, la unión de NGF ocurre solo con TrkA. Mediante el bloqueo de p75NTR, el NGF se une a TrkA induciendo su fosforilación (Fig. 5) y la activación de vías intracelulares, lo que da como resultado una disminución de la síntesis de citocinas inflamatorias después de la activación de los TLR (Fig. 13a, b) y un aumento de la síntesis de IL-10 (Fig. 13c). Esta regulación se produce mediante la activación de la vía PI3K/AKT y la inhibición de la fosforilación de GSK3 (Fig. 13d), que parecen ser mecanismos clave para limitar la respuesta inflamatoria y regular la síntesis de la inhibición de IL-10 al mismo tiempo que la síntesis de citocinas inflamatorias (18).

Estos datos muestran que el NGF, a través de TrkA, desempeña un papel antiinflamatorio, mientras que, si actúa a través de p75-NTR, mejora la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, resulta que una regulación incorrecta en la expresión de los receptores del NGF podría estar implicada en la aparición de enfermedades inflamatorias.

*Análisis de MNC y tejidos de pacientes con patologías inflamatorias crónicas*

Para probar la hipótesis de que la alteración de la relación TrkA/p75NTR puede contribuir a las patogénesis de las enfermedades inflamatorias que da como resultado la regulación incorrecta de la respuesta inflamatoria, se ha analizado la expresión de los receptores del NGF y su proporción en células mononucleares (MNC), de los líquidos sinoviales y sangre de pacientes con artritis idiopática juvenil. Los datos indican que en pacientes que padecen artritis idiopática juvenil (n = 27) existe una expresión aumentada de p75NTR y una expresión reducida de TrkA, mientras que en controles sanos (n = 16) la expresión de TrkA es siempre mayor que p75NTR. En pacientes, por lo tanto, una relación TrkA/p75NTR inferior a 1, p75NTR (Fig. 14 a), es decir, el receptor que mediante la unión al NGF es adecuado para activar las vías de señalización que inducen la síntesis de citocinas inflamatorias, es mayor. Cabe destacar que en estos pacientes existe una mayor producción del NGF en los tejidos inflamados. Por lo tanto, estos pacientes tienen una relación de receptores alterada, siendo mayor p75NTR, lo que da como resultado una relación TrkA/p75NTR inferior a 1 y cantidades significativas del NGF que interactúa preferentemente con el receptor p75-NTR, amplificando así la respuesta inflamatoria local de las células inmunitarias naturales.

Estas expresiones de TrkA disminuidas y p75NTR aumentadas que determinan una inversión de la relación TrkA/p75NTR parece ser un fenómeno compartido también por otras enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide. El líquido sinovial de estos pacientes se caracteriza por una expresión elevada de p75NTR y una expresión reducida de TrkA que determina una alteración en la relación TrkA/p75NTR (Figura 14b).

5 *Actividad de los inhibidores de p75NTR en la liberación de citocinas en sinoviocitos humanos de pacientes con artritis reumatoide*

10 Los sinoviocitos obtenidos del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide mantienen durante los experimentos *ex vivo* e *in vitro* la capacidad de segregar citocinas inflamatorias de manera espontánea. Se ha estimado la expresión de los receptores TrkA y p75NTR en estas células. La expresión de p75NTR es elevada y más alta que TrkA (Fig. 15a), con una relación de expresión de receptores TrkA/p75NTR menor que 1. Este desequilibrio de expresión de dichos receptores mencionados anteriormente es similar al que se encuentra en el líquido sinovial de estos pacientes. La adición *in vitro* del inhibidor de p75NTR dio como resultado una reducción de la síntesis espontánea de citocinas inflamatorias en estas células de pacientes (Fig. 15b), lo que confirma el potencial antiinflamatorio del bloqueo del receptor p75NTR.

BIBLIOGRAFÍA

20 1) Zeytun A et al. Crit Rev Immunol. 2010;30:53-67.

2) Bracci-Laudiero L. Nerve Growth Factor and Inflammation. <http://www.brainimmune.org>, acceso abierto 15/09/2001;

25 3) Villoslada P et al. J Exp Med. 2000; 191:1799-806

4) Arredondo LR et al. Eur J Immunol. 2001;31:625-33;

5) Flügel A et al. Eur J Immunol. 2001;31:11-22;

30 6) Micera A et al. J Neuroimmunol. 2000;104:116-23;

7) Gillardon F et al. Neuroreport. 1995;6:1322-4;

35 8) Townley SL et al. J Invest Dermatol. 2002;118:396-401;

9) Barada KA et al. Cytokine. 2007;37:236-45;

10) Reinshagen M et al. Gastroenterology. 2000;119:368-76;

40 11) Reichardt LF. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006; 361:1545-64;

12) Jiang Yet al. J Immunol. 2007;179:6297-304;

45 13) Jiang Y et al. Mol Immunol. 2008;45:1557-66;

14) Franklin RA et al. J Immunol. 1995;154:4965-72;

50 15) Wehrman T et al. Neuron. 2007;53:25-38;

16) Vilar M et al. Neuron. 2009; 62:72-83;

17) Micera A, et al. Mol Vis. 2007; 13:981-7;

55 18) Han J and Ulevitch R. Nat Immunol. (2005; 6:1198-1205;

19) Wang H. et al. Cytokine (2011); 53:130-140;

20) Peleshok J, Saragovi HU. Biochem Soc Trans. 2006;34:612-7.

60 21) Lebrun-Julien F et al. Mol Cell Neurosci. 2009; 40:410-20.

22) Saragovi HU, et al. Curr Alzheimer Res. (2009)6:419-23.

65 23) Yaar M et al. Neuropathol Appl Neurobiol. (2007);33:533-43.

- 24) Yaar M et al. *Cell Mol Neurobiol.* (2008);28:1027-31.
- 25) Maliartchouk S et al. (2000) *Mol Pharmacol.*; 57:385-91.
- 5 26) Mahapatra S et al. (2009); *J Biol Chem.* 284:33600-13.
- 27) Bai Y et al. (2010) *J Biol Chem.* 285:39392-400;
- 28) Spiegel K. et al. *Biochem Biophys Res Commun.* (1995);217:488-94.
- 10 29) Colquhoun A et al. *J Pharmacol Exp Ther.* (2004);310:505-11.
- 30) Klinger MB. et al. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2008);295:F1778-89.
- 15 31) Jang SW. et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2007);104:16329-34.
- 32) Chan CB. et al. *Oncogene.* (2009);28:3825-36.
- 33) Pehar M. et al. *Eur J Neurosci.* 2006;24:1575-80.
- 20 34) Massa SM. et al. *J Neurosci.* 17 de mayo de 2006;26(20):5288-300.
- 35) Yang T. et al. *PLoS One.* 2008;3:e3604.
- 25 36) Longo FM. et al. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2008;7:63-70.
- 37) LeSauter L. et al. *J Neurosci.* (1996); 16:1308-16.
- 38) Petersen et al., *Neuroscience* Vol. 83, N.º 1, pp. 161-168, 1998.
- 30 39) Barthel C et al. *Arthritis Research & Therapy* 2009, 11:R82

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto seleccionado de inhibidores del receptor p75NTR, solo o en asociación con al menos un compuesto seleccionado de activadores del receptor TrkA, o un compuesto seleccionado de activadores del receptor TrkA, para su uso en el tratamiento antiinflamatorio de enfermedades inflamatorias crónicas de origen autoinflamatorio o autoinmunitario, con la exclusión de enfermedades de origen alérgico, en pacientes en los que la relación de expresión receptor TrkA/receptor p75NTR es inferior a 1 en tejidos inflamados o células de fluidos biológicos; en donde los inhibidores del receptor p75NTR se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos de unión al receptor p75NTR policlonales y monoclonales mono-específicos o bio-específicos, moléculas quiméricas cuya estructura incluye el receptor p75NTR soluble, compuestos análogos a NGF cíclicos monoméricos y diméricos de unión al receptor p75NTR y en donde los activadores del receptor TrkA se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos policlonales y monoclonales de unión al receptor TrkA, compuestos análogos a NGF cíclicos monoméricos o diméricos, NGF recombinante o NGF recombinante mutado.
2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los anticuerpos monoclonales de unión al receptor p75NTR se seleccionan del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal antirreceptor p75 del factor de crecimiento nervioso humano clon ME20.4, anticuerpos monoclonales MLR-1, MLR2, MLR3, anticuerpo antirreceptor p75NTR humano clon HB-8737.
3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la molécula quimérica cuya estructura incluye el receptor p75NTR soluble es NGFR/TNFRSF16/Fc.
4. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo policlonal se selecciona entre el anticuerpo policlonal neutralizante antirreceptor p75NTR (REX), anticuerpos policlonales de conejo 9651 o 9650.
5. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los compuestos análogos a NGF cíclicos monoméricos y diméricos de unión al receptor p75NTR se seleccionan entre NGF C30-35, compuesto PD90780, compuestos LM11A.
6. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde los compuestos LM11A se seleccionan del grupo que consiste en compuestos procedentes de cafeína LM11A-24 o isoleucina LM11A-31.
7. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal de unión al receptor TrkA es 5C3.
8. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto análogo a NGF cíclico es NGF C92-97.
9. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el NGF recombinante mutado es NGFKKE/7-84-103.
10. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los activadores del receptor TrkA se seleccionan entre péptido D3, amida gámbogica, derivados de 3-aza-biciclo [3,2,1]octano.
11. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas enfermedades inflamatorias crónicas se seleccionan del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedades inflamatorias crónicas intestinales, espondilitis anquilosante, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, esclerodermia, síndrome de Sjogren.
12. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde las enfermedades inflamatorias crónicas intestinales se seleccionan de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa.
13. Combinación de al menos un compuesto inhibidor del receptor p75NTR con al menos un activador del receptor TrkA para el uso separado o secuencial en el tratamiento antiinflamatorio de enfermedades inflamatorias crónicas de origen autoinflamatorio o autoinmunitario, con la exclusión de enfermedades de origen alérgico, en pacientes en los que la relación de expresión receptor TrkA/receptor p75NTR es inferior a 1 en tejidos inflamados o células de fluidos biológicos; en donde los inhibidores del receptor p75NTR se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos de unión al receptor p75NTR policlonales y monoclonales mono-específicos o bio-específicos, moléculas quiméricas cuya estructura incluye el receptor p75NTR soluble, compuestos análogos a NGF cíclicos monoméricos y diméricos de unión al receptor p75NTR y en donde los activadores del receptor TrkA se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos policlonales y monoclonales de unión al receptor TrkA, compuestos análogos a NGF cíclicos monoméricos o diméricos, NGF o NGF recombinante o NGF recombinante mutado.
14. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dichas enfermedades inflamatorias crónicas se seleccionan del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedades

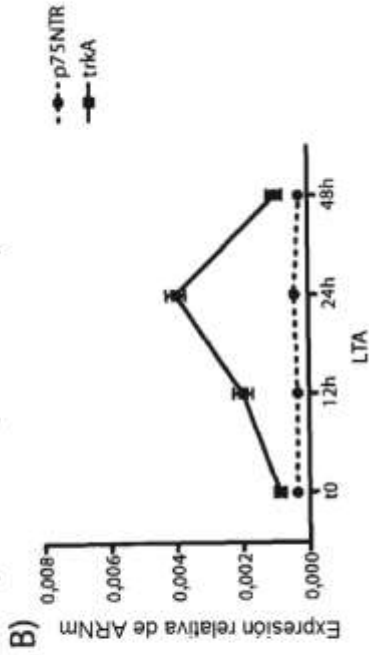
inflamatorias crónicas intestinales, espondilitis anquilosante, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, esclerodermia, síndrome de Sjogren.

5 15. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde las enfermedades inflamatorias crónicas intestinales se seleccionan de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa.

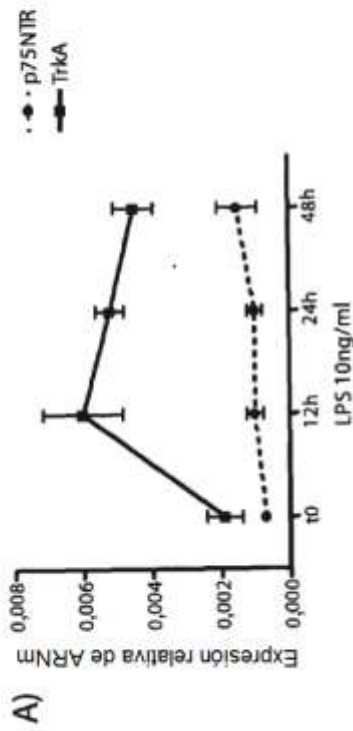
10 16. Método de detección *in vitro* para evaluar el efecto antiinflamatorio de los inhibidores farmacológicos del receptor p75NTR en enfermedades inflamatorias crónicas de origen autoinflamatorio o autoinmunitario, comprendiendo o  
consistiendo dicho método las siguientes etapas: a) poner en contacto tejidos aislados o células mononucleadas de  
un paciente afectado por una enfermedad inflamatoria crónica con dicho inhibidor; b) medir los niveles de citocinas  
proinflamatorias, liberadas espontáneamente o después de la estimulación con ligandos TLR, en donde dichas  
enfermedades inflamatorias crónicas se seleccionan del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis idiopática  
juvenil, enfermedades inflamatorias crónicas intestinales, espondilitis anquilosante, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus  
eritematoso, esclerodermia, síndrome de Sjogren.

15

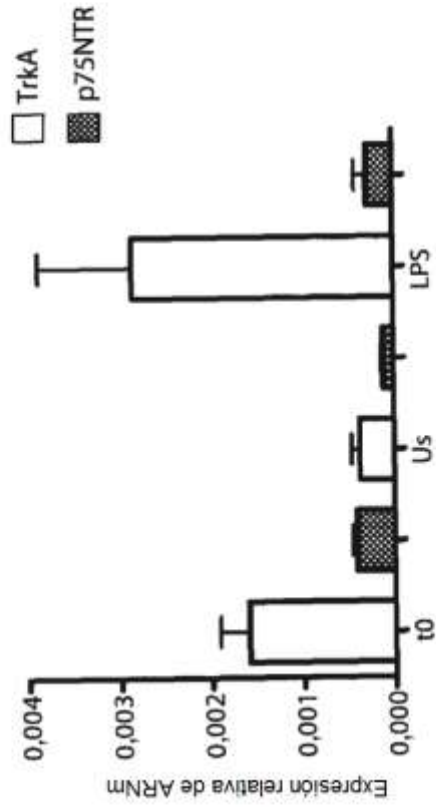
Expresión del receptor de NGF después de la estimulación con LTA



Expresión del receptor de NGF después de la estimulación con LPS



**Fig.1**



**Fig.2**





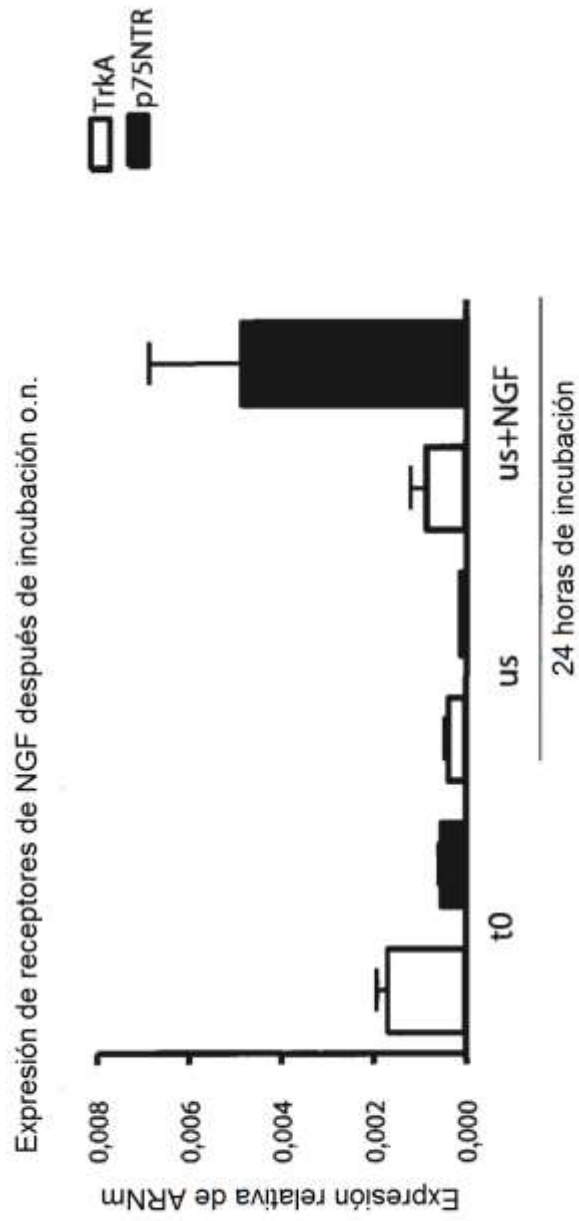
**Fig.3**



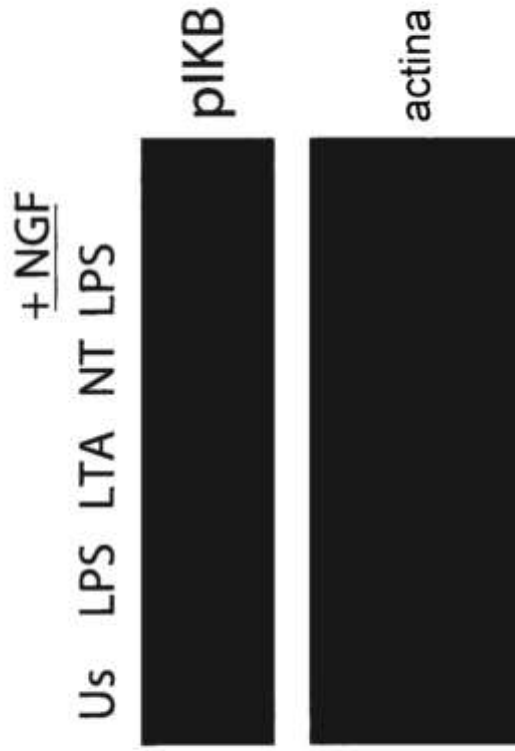
**Fig.4**



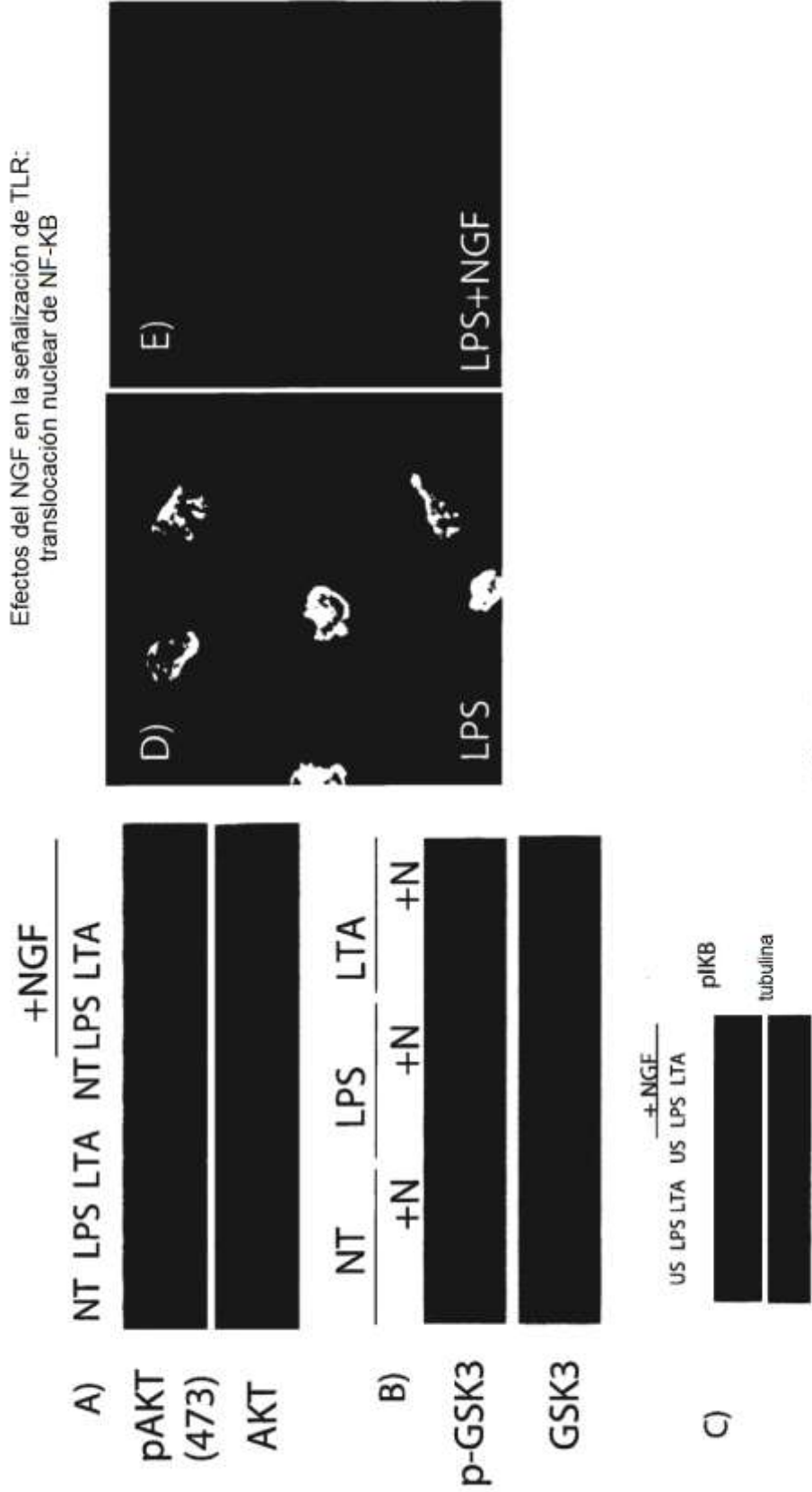
**Fig.5**



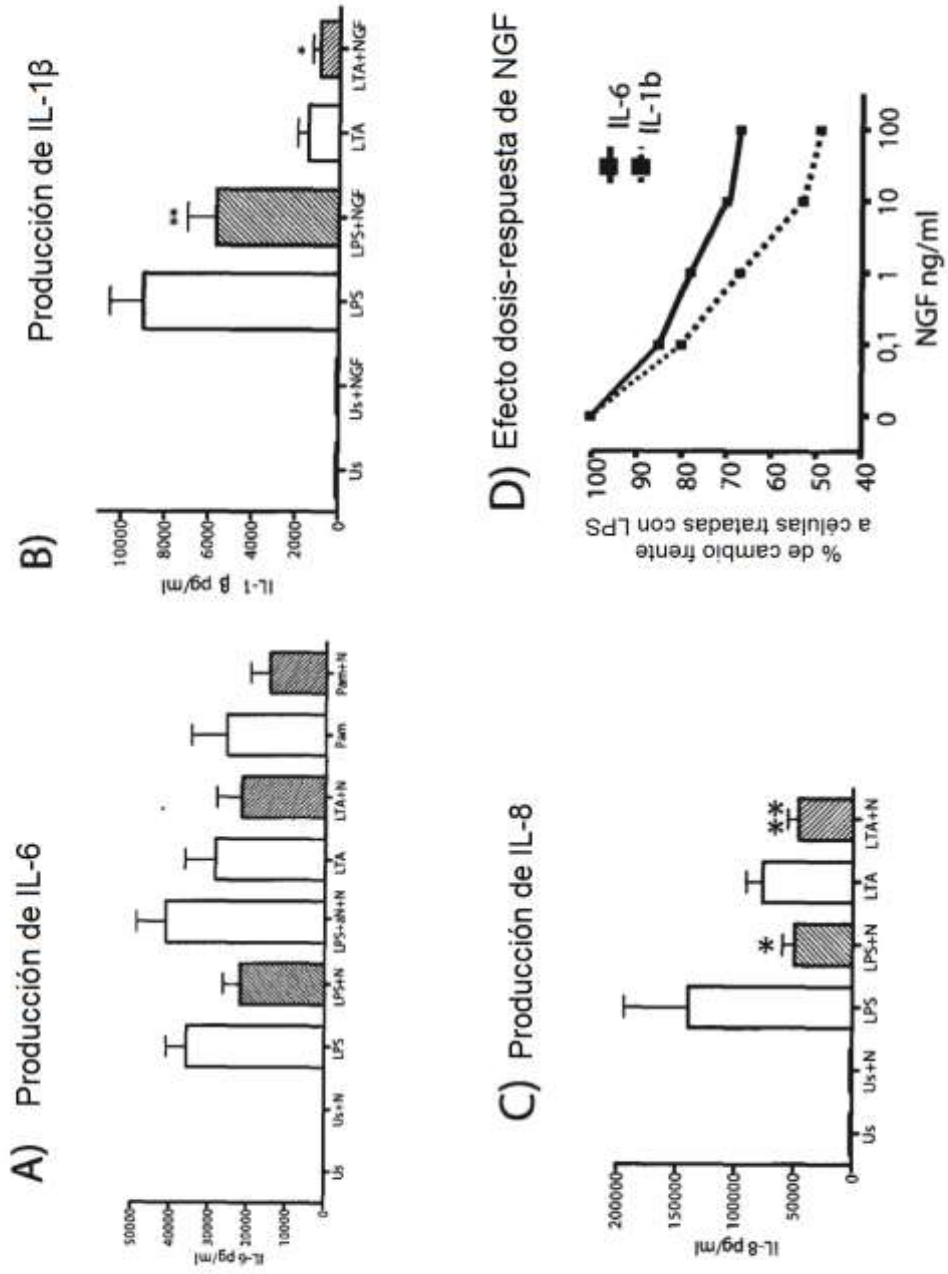
**Fig.6**



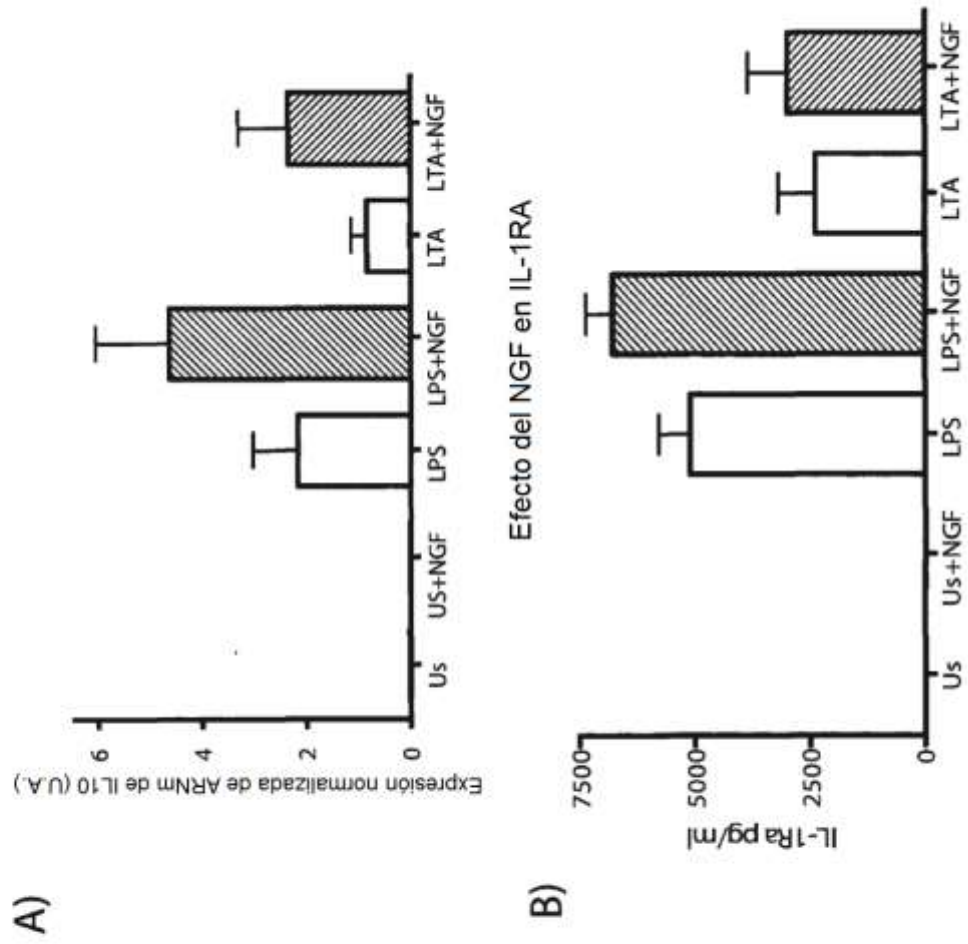
***Fig.7***



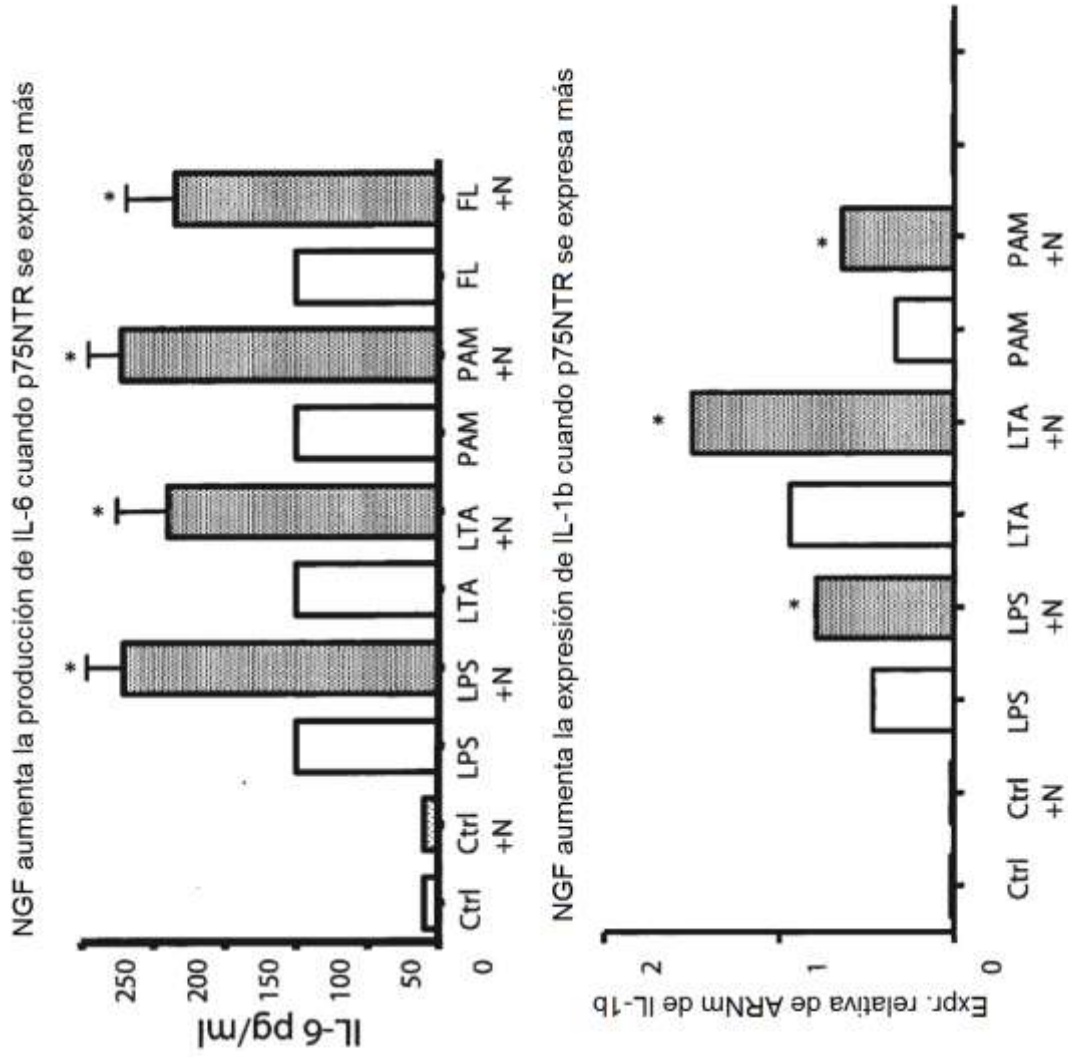
**Fig.8**



**Fig.9**



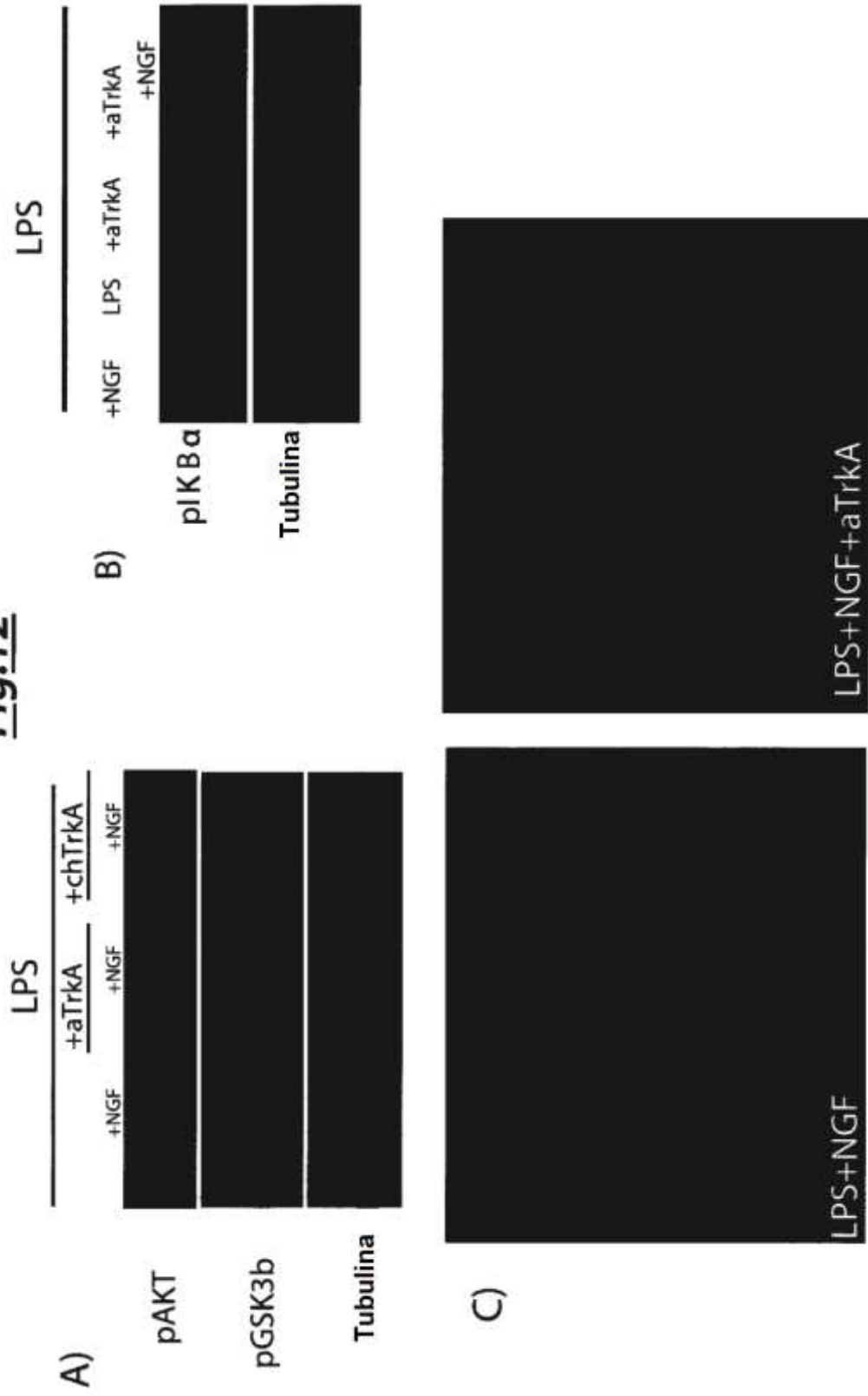
**Fig.10**

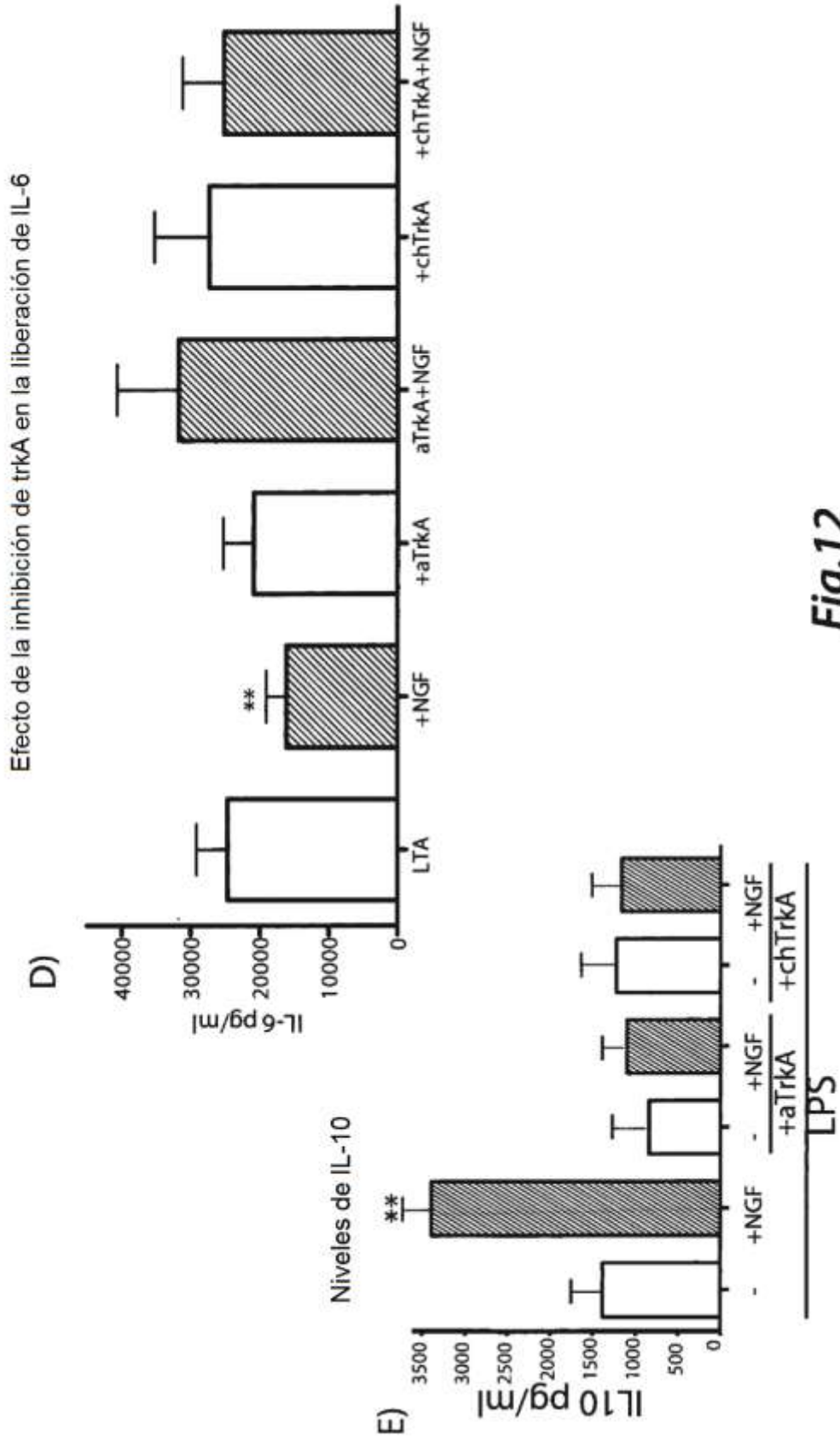


**Fig.11**

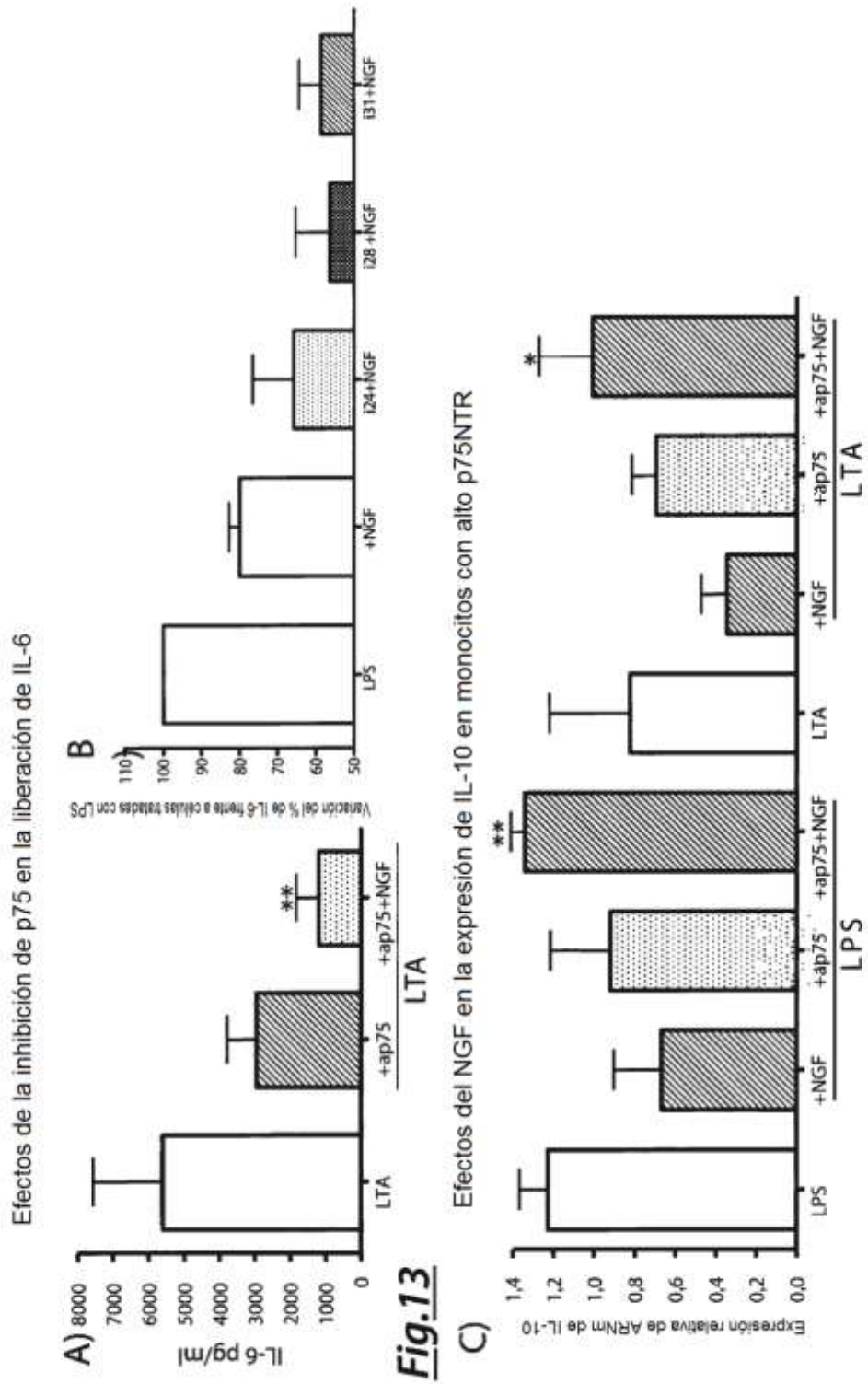


**Fig.12**

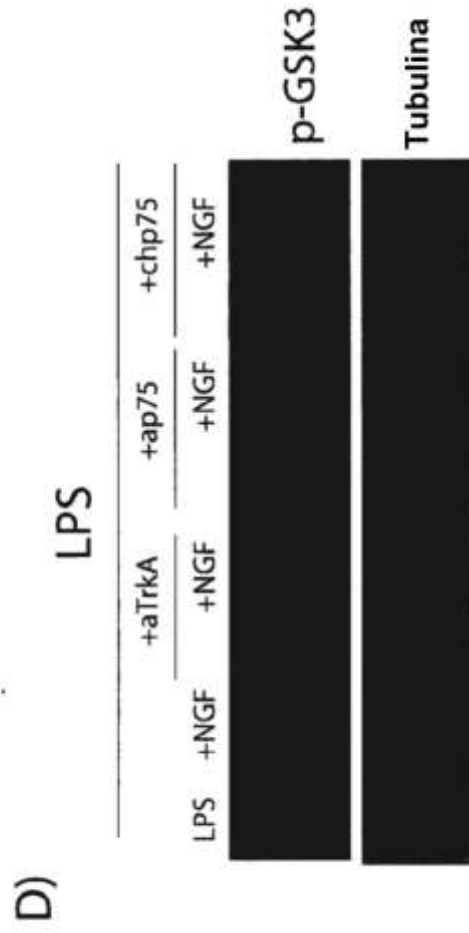




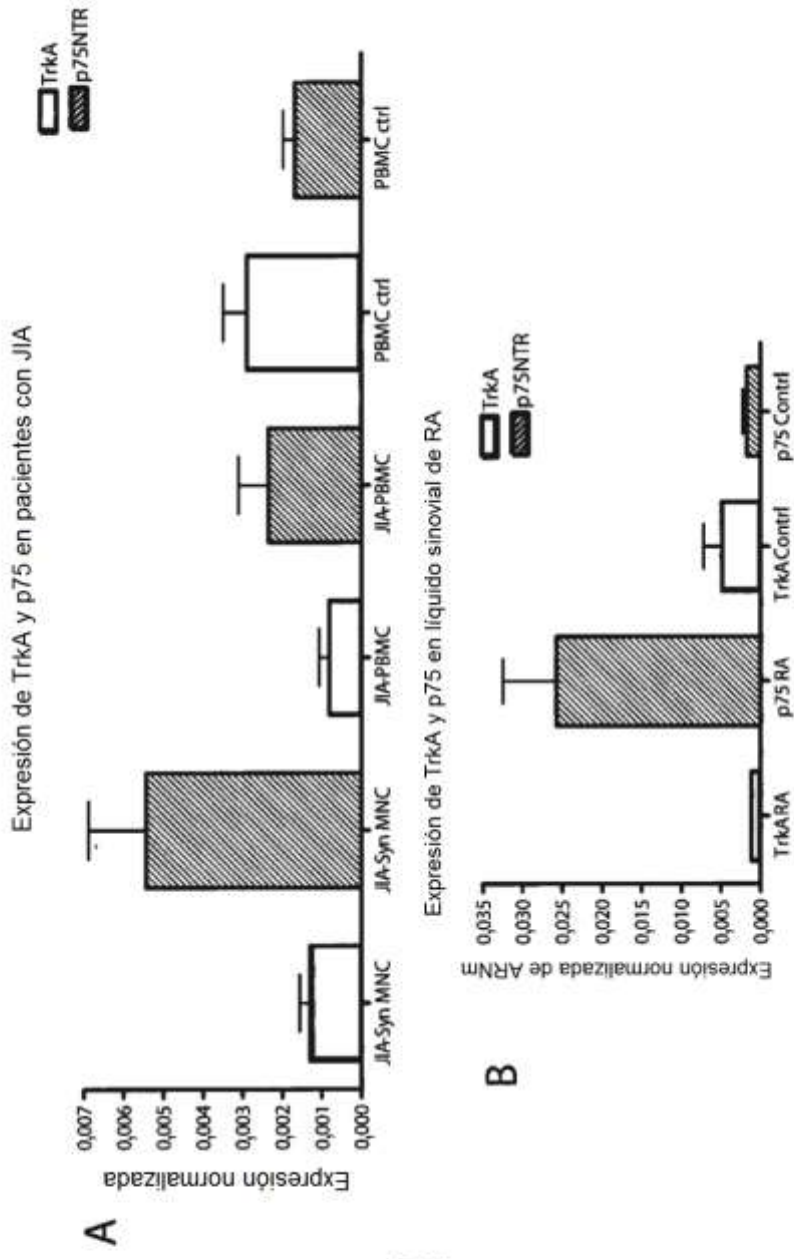
**Fig.12**



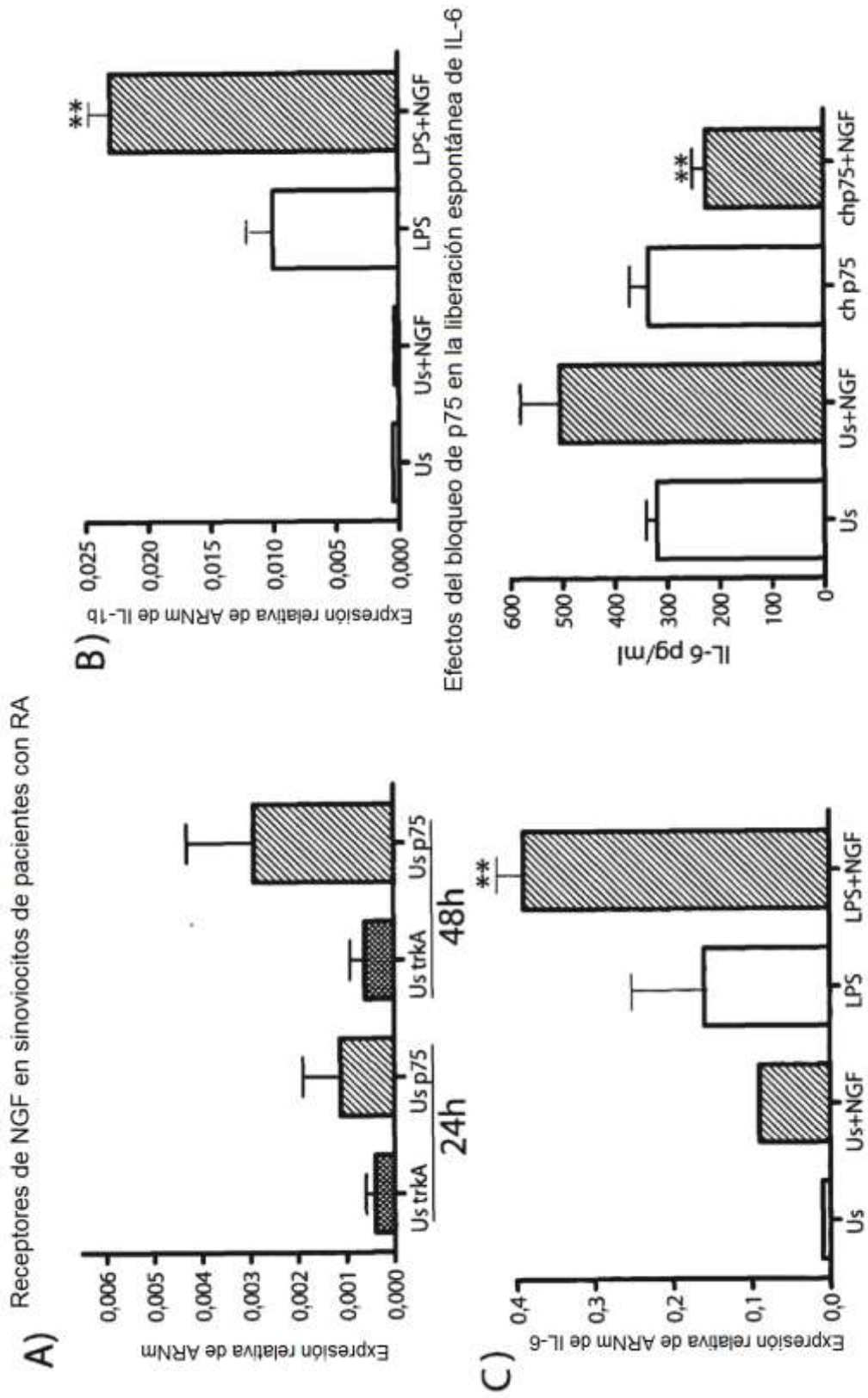
**Fig.13**



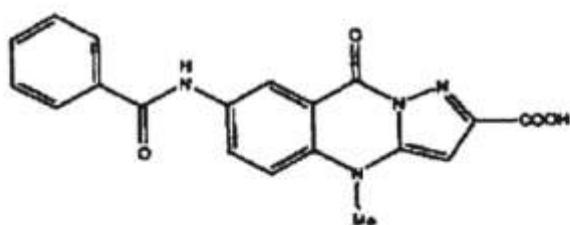
**Fig.13**



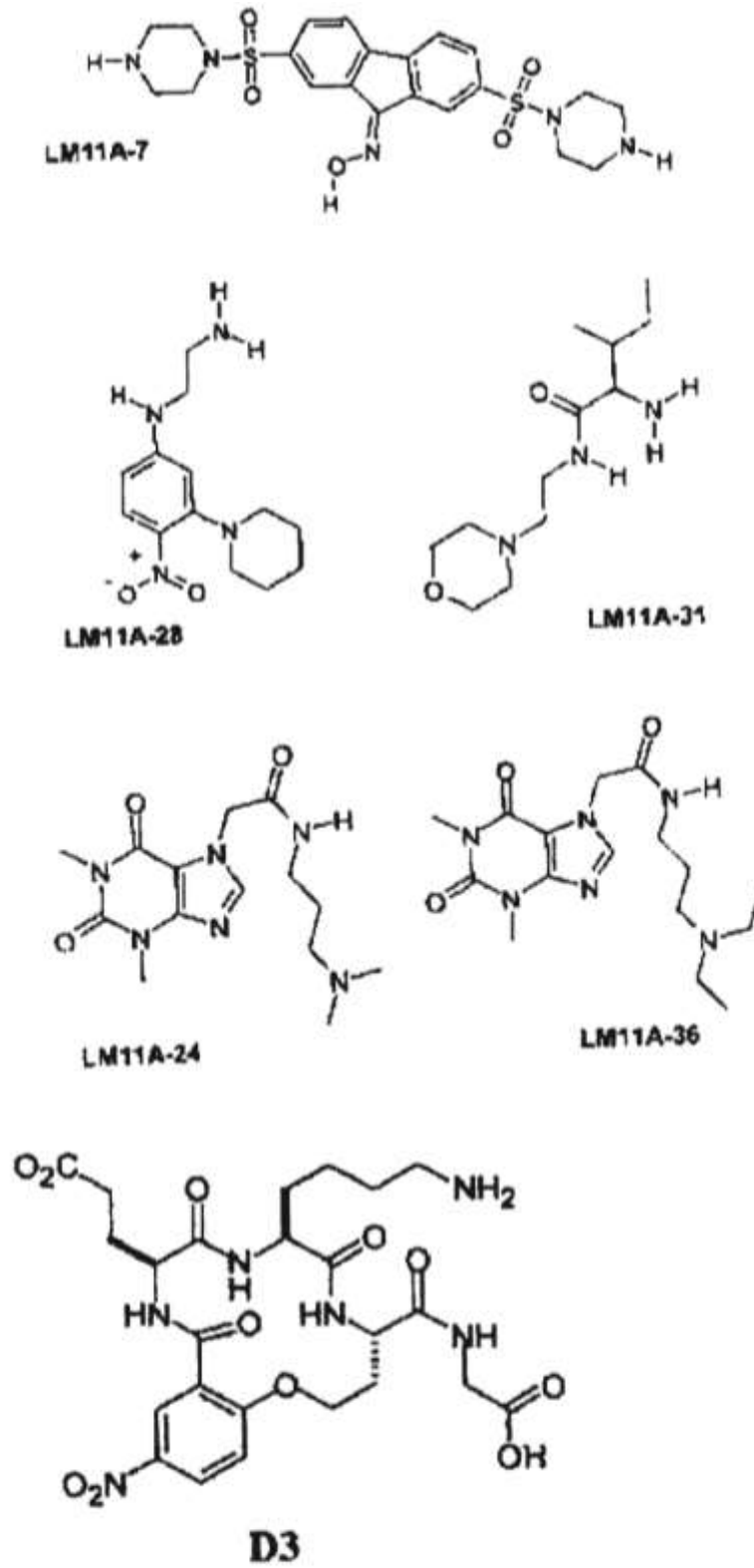
**Fig.14**



**Fig.15**



**Fig.16**



**Fig.17**