

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 341**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00	(2006.01)	A61K 47/50	(2007.01)
C07K 14/705	(2006.01)	C07K 14/48	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)	C07K 14/71	(2006.01)
C12N 15/00	(2006.01)	C07K 14/76	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01)	C07K 14/79	(2006.01)
A61K 38/19	(2006.01)	C07K 16/22	(2006.01)
C07K 14/525	(2006.01)		
A61P 29/02	(2006.01)		
A61K 38/17	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013 PCT/GB2013/050632**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13136078**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13711109 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2825208**

54 Título: **Proteína de unión a neurotrofina P75NTR para su utilización terapéutica**

30 Prioridad:

14.03.2012 US 201261610682 P

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

11.10.2017

73 Titular/es:

**LEVICEPT LTD. (100.0%)
3 Burlington Gardens
London, Greater London W1S 3EP, GB**

72 Inventor/es:

WESTBROOK, SIMON

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 637 341 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

Proteína de unión a neurotrofina P75NTR para su utilización terapéutica

Antecedentes de la invención

5 [0001] Las neurotrofinas factor de crecimiento neurotrófico (NGF, por sus siglas en inglés), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), neurotrofina 3 (NT-3) y neurotrofina 4/5 (NT-4/5) actúan por medio de cuatro receptores: el receptor neurotrófico p75 de baja afinidad (p75NTR, por sus siglas en inglés) y los receptores tirosina quinasa de alta afinidad; TrkA, TrkB y TrkC. El receptor de baja afinidad p75NTR se une y las cuatro neurotrofinas lo activan, y se ha descrito que funciona de manera independiente de los otros receptores. Sin embargo, los receptores Trk se activan de manera más selectiva, es decir, NGF es el ligando selectivo para TrkA, BDNF el ligando para TrkB y NT-3, 4/5 los ligandos para TrkC. Asimismo, se ha descrito que cuando las proteínas p75NTR y Trk se coexpresan, forman complejos que alteran las señales de ambos receptores (Huang y Reichardt, 2003). De hecho, se ha insinuado que p75NTR facilita la selectividad de cada una de las neurotrofinas para su receptor Trk respectivo.

15 [0002] El p75NTR es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR-SF, por sus siglas en inglés) y fue el primer miembro de esta superfamilia que se caracterizó completamente. La superfamilia (codificada por unos 30 genes en los humanos) se define mediante dominios de unión a ligandos que consisten en una o más repeticiones (normalmente cuatro) de un dominio rico en cisteína (CRD, por sus siglas en inglés) de 40 aminoácidos que se identificó por primera vez en p75NTR (Johnson *et al.*, 1986; Radeke *et al.*, 1987). En cambio, los dominios intracelulares de todos los miembros de la familia de TNFR-SF no comparten ningún motivo secuencial. Por consiguiente, los mecanismos de señales de las proteínas TNFR-SF varían considerablemente.

25 [0003] Una característica inusual de la estructura de p75NTR es la existencia de un dímero de p75NTR unido a disulfuro, formado por medio de residuos de cisteinil en los dominios transmembranales. Este enlace disulfuro se necesita para que el p75NTR realice una señalización eficaz dependiente de neurotrofinas y cumple una función importante en la formación de un dominio intracelular y extracelular (Vilar *et al.*, 2009b). Las neurotrofinas existen fisiológicamente como dímeros asociados de forma no covalente (Bothwell y Shooter, 1977) con una semivida de distribución de aproximadamente 5 min (Tria *et al.*, 1994). La activación de p75NTR dependiente de neurotrofinas conlleva la asociación de un dímero de neurotrofina con dominios ricos en cisteína 2-4 de los dos dominios extracelulares de un dímero p75NTR (He y Garcia, 2004). Estudios recientes respaldan un modelo en el que la unión a neurotrofinas hace que los dos dominios extracelulares de los dímeros p75NTR se junten más, lo que hace que los dominios intracelulares se separen en un movimiento similar al de las pinzas para caracoles centrado en el enlace disulfuro y hace posible una asociación de los dominios intracelulares con las proteínas adaptadoras de señales NRIF y TRAF6 (Vilar *et al.*, 2009a, 2009b). Los enlaces disulfuro de dominio intratransmembranal, tal como están presentes en p75NTR, no se han descrito anteriormente en otros miembros de la familia de TNFR-SF o en cualquier otra proteína membranal.

35 [0004] p75NTR se somete a ruptura proteolítica secuencial por medio de actividades α -secretasa y γ -secretasa y metaloproteinasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés), lo que libera su dominio intracelular (ICD, por sus siglas en inglés) en el citoplasma, de manera análoga a la vía de señalización dependiente de ruptura de la proteína precursora Notch y β -amiloide (Jung *et al.*, 2003; Kanning *et al.*, 2003). La liberación citoplásmica del ICD de p75NTR mediante esta vía estimula la señalización mediante NRIF asociada (Kenchappa *et al.*, 2006). La función del dominio extracelular de p75NTR, a continuación de la ruptura proteolítica mediante las actividades α -secretasa y γ -secretasa y las MMP no se entiende completamente.

45 [0005] Se ha documentado que NGF y otras neurotrofinas (BDNF, NT-3 y NT-4/5) cumplen una función primordial en la patología, por ejemplo, el dolor causado por la osteoartritis, la pancreatitis, la artritis reumatoide, la psoriasis, el prurito y la esclerosis múltiple (Watanabe *et al.*, 2010; Raychaudhuri *et al.*, 2011; Barthel *et al.*, 2009; Truzzi *et al.*, 2011; McDonald *et al.*, 2011; Yamaoka *et al.*, 2007). Se ha demostrado que los anticuerpos selectivos a cualquiera de las neurotrofinas, bien NGF o BDNF, NT-3 y NT-4/5, reducen el dolor considerablemente. Asimismo, también se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos a los receptores de neurotrofina p75NTR Trk A, Trk B o Trk C son eficaces en modelos de dolor (Orita S *et al.*, 2010; Svensson P *et al.*, 2010; Iwakura *et al.*, 2010; Cirilio *et al.*, 2010; Pezet *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2011; Ueda *et al.*, 2010; Ghilardi *et al.*, 2010; Fukui *et al.*, 2010). Fukui *et al.*, (2010) en un modelo de dolor (alodinia mecánica después de un aplastamiento del nervio ciático) demostró una eficacia considerable en criterios de valoración relacionados con el dolor tras un tratamiento con un anticuerpo anti-p75NTR. A partir de este estudio, se llegó a la conclusión de que el tratamiento con un anticuerpo inhibitorio p75NTR redujo la expresión de CGRP y p75NTR, lo que dio lugar a una reducción considerable del dolor.

55 [0006] La presente invención demuestra que el dominio extracelular de p75NTR, exógeno o endógeno después de la ruptura de la membrana celular actúa como una proteína de unión a neurotrofina o receptor soluble a cada una de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 y desempeña un papel primordial en la función, fisiología y

homeostasis de la función neurotrófica. Además, se describe la utilización del dominio extracelular de p75NTR para modular o neutralizar las acciones patológicas de los factores neurotróficos, incluidos NGF, BDNF, NT-3 y NT4/5, por ejemplo, en modelos de alodinia estática e hiperalgia térmica. Por consiguiente, la proteína de unión a neurotrofina p75NTR es útil para el tratamiento del dolor y otras patologías relacionadas con el factor neurotrófico tales como la psoriasis, el eccema, la artritis reumatoide, la cistitis, la endometriosis y la osteoartritis.

Breve descripción de la invención

[0007] Según un primer aspecto de la presente invención, se da a conocer una proteína de unión a neurotrofina p75NTR, (NBP, por sus siglas en inglés) para su utilización en el tratamiento del dolor, como se define en la reivindicación. Según un segundo aspecto de la presente invención, se da a conocer una proteína de unión a neurotrofina p75NTR para su utilización según el primer aspecto donde, la p75NTR(NBP) comprende p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares. Preferiblemente, la p75NTR(NBP) se conecta a la una o más moléculas auxiliares por medio de uno o más enlaces. Según un tercer aspecto de la exposición, se da a conocer una molécula de ácido nucleico que codifica la p75NTR(NBP) o p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares de la p75NTR(NBP); según el primer o el segundo aspecto la molécula de ácido nucleico puede comprender también la codificación de una secuencia señal. También se da a conocer la utilización de la molécula de ácido nucleico para el tratamiento del dolor. Según un cuarto aspecto de la exposición, se da a conocer un vector de expresión replicable para la transfección de una célula, comprendiendo el vector la molécula de ácido nucleico del tercer aspecto; preferiblemente, el vector es un vector viral. También se da a conocer la utilización del vector para el tratamiento del dolor. Según un quinto aspecto de la exposición, se da a conocer una célula huésped que alberga la molécula de ácido nucleico del tercer o el cuarto aspecto. Según un sexto aspecto de la exposición, se da a conocer la p75NTR(NBP) para su utilización según el primer o segundo aspecto o modos de realización preferidos de la misma, o el ácido nucleico o vector para su utilización según el tercer y el cuarto aspecto donde la p75NTR(NBP) o la molécula de ácido nucleico o vector se utilizan de forma separada, secuencial o simultánea en una combinación combinada con un segundo compuesto farmacológicamente activo.

Descripción de las figuras

[0008]

- Figura 1. Secuencia de dominio extracelular p75NTR; dominios de unión a neurotrofina destacados en negrita.
- Figura 2. Fragmentos estándar peptídicos p75NBPP y coinmunoprecipitación de p75NTR(NBP) y NGF que muestran el complejo p75NTR(NBP) -NGF en el plasma humano.
- Figura 3. Confirmación de secuencia MS/MS del pico WADAECEEIPGR (SEQ ID NO.7) mostrado en la figura 2.
- Figura 4. p75NTR(NBP) inhibe la función NGF en la línea celular U20S que expresa TrkA y en la línea celular U20S que coexpresa TrkA y p75NTR.
- Figura 5. p75NTR(NBP) soluble inhibe la función BDNF en la línea celular U20S que expresa TrkA y en la línea celular U20S que coexpresa TrkA y p75NTR.
- Figura 6. Datos de Biocore que demuestran la unión de p75NTR(NBP) a BDNF y la competencia entre antiBDNF y p75NTR(NBP).
- Figura 7. Inhibición p75NTR(NBP) de actividad NGF en células PC12
- Figura 8. La proteína de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) inhibe el efecto de dolor BDNF en un modelo de excitabilidad de los nervios
- Figura 9. La proteína de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) inhibe la hiperalgia en un modelo UVIH
- Figura 10. SEQ ID NO. 1 secuencia de aminoácidos completa de p75NTR humano
- Figura 11. SEQ ID NO. 2 dominio extracelular de p75NTR humano que incluye secuencia señal
- Figura 12. SEQ ID NO. 3 dominio extracelular de p75NTR humano sin secuencia señal
- Figura 13. SEQ ID NO. 4 dominio 1 de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) humana
- Figura 14. SEQ ID NO. 5 dominio 2 de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) humana
- Figura 15. SEQ ID NO.6 dominio 3 de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) humana

Figura 16. SEQ ID NO. 7 dominio 4 de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) humana

Figura 17. SEQ ID NO. 8 dominio 5 de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) humana

Figura 18. SEQ ID NO. 9 transferrina humana

Figura 19. SEQ ID NO. 10 albúmina humana

5 Figura 20. SEQ ID NO. 11 Fc IgG1 humana

Figura 21. SEQ ID NO. 12 Fc IgG2 humana

Figura 22. SEQ ID NO. 13 Fc IgG3 humana

Figura 23. SEQ ID NO. 14 Fc IgG4 humana

Figura 24. SEQ ID NO. 15 Fragmento Fc humano creado para semivida de suero extendida

10 Figura 25. SEQ ID NO. 16 Fragmento Fc humano creado para funciones de falta de efector

Figura 26. SEQ ID NO 17 enlace p75NTR(NBP)-Fc

Figura 27: SEQ ID NO. 18 enlace p75NTR(NBP)-Fc

Figura 28: SEQ ID NO. 19 enlace p75NTR(NBP)-Fc

Descripción detallada de la invención

15 **[0009]**

- Según un primer aspecto de la presente invención expuesto, se da a conocer una proteína de unión a neurotrofina p75NTR, p75NTR(NBP), para su utilización en el tratamiento del dolor o para la prevención y/o el tratamiento del dolor y/o los síntomas de dolor o para mejorar, controlar, reducir la incidencia del desarrollo o la evolución del dolor y/o los síntomas de dolor o retrasar los mismos. Preferiblemente, la proteína de unión a neurotrofina p75NTR, p75NTR(NBP), está pegilada, más preferiblemente está glicosilada.

20 **[0010]** La proteína de unión a neurotrofina p75NTR, p75NTR(NBP), preferiblemente comprende (a) uno o más de los dominios de unión a neurotrofina 1 [SEQ ID NO. 4], 2 [SEQ ID NO. 5], 3 [SEQ ID NO. 6], 4 [SEQ ID NO. 7], o 5 [SEQ ID NO. 8]. Más preferiblemente, la p75NTR(NBP) comprende (b) cada uno de los dominios de unión a neurotrofina 1 [SEQ ID NO. 4], 2 [SEQ ID NO. 5], 4 [SEQ ID NO. 7] y 5 [SEQ ID NO. 8] o (c) cada uno de los dominios de unión a neurotrofina 1 [SEQ ID NO. 4], 3 [SEQ ID NO. 6], 4 [SEQ ID NO. 7] y 5 [SEQ ID NO. 8]. Más preferiblemente, la p75NTR(NBP) comprende el dominio extracelular 2 [SEQ ID NO. 3] o una parte del mismo que comprende (a), (b) o (c) citados anteriormente. Más preferiblemente, la p75NTR(NBP) comprende el dominio extracelular 1 [SEQ ID NO. 2] o una parte del mismo que comprende (a), (b) o (c) citados anteriormente.

30 **[0011]** Preferiblemente, la p75NTR(NBP) se une a cada una de las neurotrofinas NGF, NT3, BDNF y NT4/5, preferiblemente NGF, NT3, BDNF y NT4/5 humanas. Más preferiblemente, la p75NTR(NBP) se une a cada una de las neurotrofinas NGF, NT3, BDNF y NT4/5, preferiblemente NGF, NT3, BDNF y NT4/5 humanas, preferiblemente con una constante de unión equivalente a la secuencia completa nativa p75NTR [SEQ ID NO. 1 o igual que la misma. Las constantes de unión pueden determinarse mediante la utilización de los ensayos descritos en el presente documento tales como la utilización de resonancia de plasmones superficiales a 20 °C; los ensayos para las constantes de unión de proteína nativa se conocen y comprenden los ensayos a partir de células conocidos en la técnica. Preferiblemente, la p75NTR(NBP) protege una o más de las neurotrofinas mencionadas anteriormente de la degradación en plasma u otros fluidos corporales, *in-vitro* o *in-vivo*, y/o mantiene un equilibrio homeostático de una o más de las neurotrofinas mencionadas anteriormente en comparación con su forma libre biológica.

40 **[0012]** La p75NTR(NBP) de la presente invención preferiblemente se une a cualquiera o cualesquiera de NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 con una afinidad de unión (K_d) de entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 50 nM. En algunos modos de realización preferidos, la afinidad de unión (K_d) se encuentra entre aproximadamente 0,1 nM y cualquier cantidad de aproximadamente 0,2 nM, 0,5 nM, 1nM, 1,5 nM, 2 nM, 2,5 nM, 3 nM, 3,5 nM, 4 nM, 4,5 nM, 5 nM, 5,5 nM, 6 nM, 6,5 nM, 7 nM, 7,5 nM, 8 nM, 8,5 nM, 9 nM, 9,5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 35 nM, 40 nM, 45 nM o 50 nM medido en un ensayo de unión *in vitro* para NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 tal como se describe en el presente documento preferiblemente medido mediante resonancia de plasmones superficiales a 20 °C. En algunos otros modos de realización preferidos, la afinidad de unión (K_d) es o es menor que una cantidad de aproximadamente 250 pM, 300 pM, 350 pM, 400 pM, 450 pM, 500 pM, 550 pM, 600 pM, 650 pM, 700 pM, 750 pM, 800 pM, 850 pM, 950 pM o 1 nM medido en un ensayo de unión *in vitro* para p75NTR(NBP) con las neurotrofinas tal como se describen en el presente documento, preferiblemente medido

mediante resonancia de plasmones superficiales a 20 °C. En un modo de realización todavía más preferido, la afinidad de unión (K_d) es aproximadamente 0,3 nM o aproximadamente 1 nM, medido en un ensayo de unión *in vitro* para p75NTR(NBP) con las neurotrofinas tal como se describen en el presente documento, preferiblemente medido mediante resonancia de plasmones superficiales a 20 °C.

5 **[0013]** Más preferiblemente, la p75NTR(NBP) incide en la actividad funcional de las neurotrofinas mencionadas anteriormente, (definido como modulación o disminución o aumento de la actividad funcional de las neurotrofinas) NGF, BDNF, NT3 o NT4/5, por ejemplo la actividad funcional de las neurotrofinas mencionadas anteriormente resultantes de su interacción con sus respectivos receptores.

10 **[0014]** Preferiblemente, la p75NTR(NBP) incide en la actividad funcional de BDNF evaluada mediante el ensayo funcional de cualesquiera del crecimiento y la diferenciación de las neuronas y las sinapsis, la supervivencia y la diferenciación en cultivo celular de neuronas, la señalización Trk, la estimulación del crecimiento axonal *in vitro* o *in vivo*.

15 **[0015]** Preferiblemente, la p75NTR(NBP) incide en la actividad funcional de NGF evaluada mediante la medición de la unión de NGF a TrkA y su activación, como se demuestra en los ensayos clásicos de supervivencia neuronal (tal como se describe en Cowan, W.M., Hamburger, V., Levi-Montalcini, R. Annu. Rev. Neurosci. 2001;24:551-600).

20 **[0016]** Preferiblemente, la p75NTR(NBP) incide en la actividad funcional de NT3 evaluada mediante la medición de la actividad de la unión de NT3 al receptor Trk endógeno y su activación, como se demuestra en la fosforilación del receptor Trk, en ensayos indicadores de fosforilación de proteína quinasa activada por mitógeno o ensayos de supervivencia celular y de extensión neurítica.

25 **[0017]** Preferiblemente, la p75NTR(NBP) incide en la actividad funcional de NT4/5 evaluada mediante la medición de la fosforilación de NT4/5 *in vitro* o *in vivo* y mediante ensayos de activación, por ejemplo, en ensayos de fosforilación de proteína básica de la mielina (PBM) o, alternativamente, *in vivo* en un ensayo de angiogénesis mediante Matrigel del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés)/angiogénesis inducida por el factor de crecimiento fibroblástico básico.

[0018] Preferiblemente, la p75NTR(NBP) se une a los residuos de contacto de una o más de las neurotrofinas NGF, NT3, BDNF y NT4/5 como se muestra en He y Garcia (2001) Science, 301, páginas 870 - 805.

[0019] Preferiblemente, la p75NTR(NBP) es soluble, preferiblemente soluble en solución acuosa, preferiblemente soluble en un fluido biológico tal como suero, plasma o sangre.

30 - Según un segundo aspecto de la presente invención, se da a conocer una p75NTR(NBP) para su utilización según el primer aspecto donde la p75NTR(NBP) comprende p75NTR(NBP), estando preferiblemente la p75NTR(NBP) del primer aspecto conectada a una o más moléculas auxiliares. Preferiblemente, la p75NTR(NBP) se conecta a la una o más moléculas auxiliares por medio de uno o más enlaces.

35 **[0020]** Preferiblemente, la una o más moléculas auxiliares se seleccionan entre: (a) transferrina o una parte de la misma, preferiblemente la transferrina es transferrina humana, preferiblemente SEQ ID NO. 9, (b) albúmina o una parte de la misma, preferiblemente la albúmina es albúmina humana, preferiblemente SEQ ID NO. 10 (c) una inmunoglobulina Fc o una parte de la misma, preferiblemente la inmunoglobulina Fc es inmunoglobulina humana Fc, (d) una cadena polimérica de polietilenglicol (e) una cadena de carbohidratos.

40 **[0021]** Como se utiliza en el presente documento, se entiende por "inmunoglobulina Fc" o "Ig Fc" la porción carboxiterminal de una región constante de cadena de inmunoglobulina, preferiblemente una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o una parte de la misma. Preferiblemente, la inmunoglobulina Fc comprende 1) un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3, opcionalmente con una región de bisagra de inmunoglobulina, 2) un dominio CH1 y un dominio CH2, opcionalmente con una región de bisagra de inmunoglobulina, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, opcionalmente con una región de bisagra de inmunoglobulina, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3, opcionalmente con una región de bisagra de inmunoglobulina o 5) una combinación de dos o más dominios seleccionados entre CH1, CH2 y CH3 opcionalmente combinados con una región de bisagra de inmunoglobulina. Preferiblemente, la inmunoglobulina Fc comprende al menos una región de bisagra de inmunoglobulina, un dominio CH2 y un dominio CH3 y opcionalmente un dominio CH1. Preferiblemente, la inmunoglobulina Fc comprende una Fc o una parte de una Fc de una inmunoglobulina de isótopo seleccionada entre IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, más preferiblemente, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgA, más preferiblemente IgG2 o IgG4, más preferiblemente IgG2, o consiste en las mismas. Opcionalmente, la inmunoglobulina Fc también comprende mutaciones de aminoácidos, deleciones, sustituciones o modificaciones químicas que sirven para minimizar la fijación del complemento o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o que mejoran la afinidad de unión al receptor Fc.

55 **[0022]** Más preferiblemente, la inmunoglobulina Fc comprende o consiste en cualquiera de: (a) un dominio CH2 o parte del mismo y un dominio CH3 o parte del mismo, (b) un dominio CH2 o parte del mismo, o (c) un dominio

CH3 o parte del mismo, donde la inmunoglobulina Fc o parte de la misma es del isotipo seleccionado entre IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, más preferiblemente, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, sIgA, más preferiblemente IgG2 o IgG4, más preferiblemente IgG2.

5 **[0023]** Preferiblemente, la inmunoglobulina Fc comprende la región carboxiterminal de una cadena pesada de inmunoglobulina o consiste en la misma y puede comprender los dominios CH2 y/o CH3, o partes de los mismos, entre isotipos de anticuerpos IgG, IgA o IgD o los dominios CH2 y/o CH3 y/o CH4 o partes de los mismos entre IgM o IgE. Preferiblemente, la inmunoglobulina Fc comprende un fragmento de la Fc o consiste en el mismo, que comprende principalmente CH3 y una pequeña parte de CH2, como se puede derivar de la digestión de pepsina de la inmunoglobulina. Preferiblemente, la inmunoglobulina Fc comprende la región Fc completa o consiste en la
10 misma, que comprende CH2 y CH3, adicionalmente conectados a la región de bisagra que es un segmento corto de cadena pesada que conecta las regiones CH1 y CH2 en la inmunoglobulina intacta, que puede producirse por la digestión de la papaína de la inmunoglobulina. Preferiblemente, la región de bisagra de inmunoglobulina comprende o consiste en una región de bisagra o parte de una región de bisagra derivada de una IgG, preferiblemente IgG humana, más preferiblemente seleccionada entre IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4, más
15 preferiblemente IgG1 o es, de forma alternativa, una especie o variante alélica de los modos de realización de región de bisagra anteriores. La región de bisagra o una parte de una región de bisagra de inmunoglobulina puede situarse en el extremo C- o N-terminal de la región Fc, preferiblemente en el extremo N-terminal.

[0024] Según un modo de realización preferido de la presente invención, la inmunoglobulina Fc preferiblemente comprende una Fc o una parte de una Fc de una inmunoglobulina o consiste en la misma, que comprende una o
20 más mutaciones de aminoácidos de la secuencia natural en la región CH2 que reducen la función efectora de Fc. Preferiblemente, estas mutaciones son A330, P331 a S330, S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia natural IgG2, donde la región CH2 está en la región constante de IgG2 de cadena pesada humana. [Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624]. Preferiblemente, la inmunoglobulina Fc está glicosilada y altamente cargada de pH fisiológico, de modo que ayuda a solubilizar la p75NTR(NBP). La región Fc también permite la
25 detección de la p75NTR(NBP) mediante ELISA antiFc, por ejemplo, con fines de diagnóstico. La p75NTR(NBP) de la invención está preferiblemente sintetizada en una célula que glicosila la Ig Fc preferiblemente en sitios de glicosilación normales.

[0025] Preferiblemente, la inmunoglobulina Fc comprende o consiste en una región de inmunoglobulina humana Fc de secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID No. 11, 12, 13, 14, 15 o 16 o una especie o variante
30 alélica de las mismas, o los dominios CH2 y/o CH3 o partes de los mismos derivadas de la SEQ ID NO. 11, 12, 13, 14, 15 o 16.

[0026] Según la presente invención, la p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares preferiblemente demuestra las propiedades biológicas ventajosas de solubilidad mejorada de p75NTR(NBP) y/o la estabilidad de p75NTR(NBP) y/o la semivida de suero mejorada de p75NTR(NBP). Se desea una mejora de la
35 solubilidad con el fin de maximizar la biodisponibilidad de la p75NTR(NBP) para su administración y con el fin de que se pueda determinar y llevar a cabo una dosis exacta de la p75NTR(NBP). La mejora de la solubilidad es ventajosa para superar el problema de los agregados, que no se desean, ya que provocan dolor en la administración *in vivo* y conllevan una posible inflamación. La mejora de la semivida de suero presenta la ventaja de facilitar niveles reducidos o una frecuencia reducida de la dosis requerida durante la utilización para el
40 tratamiento con el fin de conseguir el efecto terapéutico equivalente o mantenido de la p75NTR(NBP) administrada. Una prolongación de la semivida y una mayor estabilidad en sangre o suero presentan la ventaja de permitir una pauta posológica con dosis menos frecuentes y/o niveles de dosis menores, lo que reduce la posible toxicidad o los posibles efectos secundarios *in vivo*. En este caso, la p75NTR(NBP) es más potente en cuanto a su efecto terapéutico y/o más estable en la circulación. El número de dosis más bajo o menos
45 frecuentes resultantes es ventajoso en la minimización de cualquier posible efecto tóxico o efecto secundario potencialmente asociado a la administración de p75NTR(NBP). El peso molecular de la p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares también aumenta a lo largo de la p75NTR(NBP) solamente, lo que presenta la ventaja la molécula quedará bien retenida en la circulación sanguínea cuando se administre de forma intravenosa, lo que reduce el riesgo de penetración en sitios no deseados, por ejemplo, el sistema nervioso
50 central y lo que convierte a la molécula en adecuada para la retención o concentración en los tejidos diana.

[0027] Preferiblemente, la p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares demuestra una mejora en la solubilidad de p75NTR(NBP) y/o una mejora en la estabilidad de p75NTR(NBP) y/o una mejora en la semivida de suero en comparación con la p75NTR(NBP) no conectada de tal manera. Preferiblemente, la solubilidad
55 mejorada es solubilidad en una solución acuosa tal como agua preferiblemente con excipientes tales como tampones y/o sales a preferiblemente a un pH fisiológico, preferiblemente a entre pH 5 y pH 8, preferiblemente aproximadamente pH 7 o es solubilidad en un fluido biológico tal como suero o sangre. Preferiblemente, la estabilidad mejorada es estabilidad de actividad o integridad estructural de la proteína p75NTR(NBP) debido a los efectos de la desnaturalización, oxidación, fragmentación o agregación durante un periodo de tiempo, durante un periodo de almacenamiento o después de congelación y descongelación. La estabilidad estructural puede
60 calcularse mediante medidas estándar de desnaturalización, oxidación, agregación o agregación. La estabilidad

de actividad puede medirse mediante los ensayos de unión o ensayos funcionales expuestos en el presente documento. Se conocen métodos de medición de la semivida de suero de la proteína.

5 **[0028]** Preferiblemente, la p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares puede expresarse a altos niveles a partir de una variedad de células huésped de mamífero para proporcionar una única especie y puede
 10 purificarse de forma eficaz mediante cromatografía de afinidad, por ejemplo, mediante unión a la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Preferiblemente, la p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares puede dimerizar y, preferiblemente, el dímero tiene afinidad aumentada a las neurotrofinas NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 en comparación con la p75NTR(NBP) no conectada de tal manera. Una unión más ajustada presenta la ventaja de una potencia mayor y una eficacia terapéutica mayor, como se calcula mediante los efectos de la p75NTR(NBP), por ejemplo, como se determina mediante los ensayos funcionales de neurotrofina expuestos en el presente documento. Un aumento de la potencia presenta el beneficio de que la p75NTR(NBP) pueda utilizarse en cantidades de dosis menores para conseguir la misma eficacia terapéutica, de forma que se reduce la posible toxicidad o efectos secundarios *in vivo*.

15 **[0029]** Preferiblemente, la p75NTR(NBP) de la invención tiene una semivida *in vivo* de aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 62, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208 o 210 horas o más +/-1 hora; más preferiblemente la p75NTR(NBP) de la invención tiene una semivida *in vivo* de
 20 aproximadamente 24 horas o más.

[0030] Más preferiblemente, la p75NTR(NBP) de la invención tiene una semivida *in vitro* de aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 62, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208 o 210 días o más +/-1 día, más preferiblemente la p75NTR(NBP) de la invención tiene una semivida *in vitro* de aproximadamente 6 días o más. Preferiblemente, la estabilidad se mide a aproximadamente pH fisiológico, en una solución acuosa tamponada, preferiblemente a 20 °C o 37 °C.

25 **[0031]** Según los modos de realización preferidos anteriores, preferiblemente la semivida *in vitro* es semivida en rata o semivida en humano, más preferiblemente en humano. Preferiblemente, la semivida se determina a partir de mediciones de suero de los niveles de p75NTR(NBP) de la invención tras administración *in vivo*, por ejemplo, mediante inyección intravenosa o subcutánea.

30 – *Todavía según el segundo aspecto de la invención*, el enlace se selecciona preferiblemente entre: (a) un enlace covalente, (b) un enlace no covalente, (c) un enlace peptídico, (d) un aminoácido o una pluralidad de aminoácidos que comprende un péptido. Preferiblemente, la p75NTR(NBP) se conecta a más de una molécula auxiliar, opcionalmente cada molécula auxiliar es, bien la misma, bien diferente o una mezcla de la misma y la diferente. Mas preferiblemente, la más de una molécula auxiliar comprende un múltiplo o una pluralidad de moléculas auxiliares enlazadas a p75NTR(NBP) mediante un enlace y donde cada molécula puede ser la misma o diferente o una mezcla de la misma y la diferente.

35 **[0032]** Preferiblemente, el enlace comprende o consiste en un aminoácido o una pluralidad de los mismos o comprende o consiste en una secuencia polipeptídica de aminoácidos, preferiblemente aproximadamente 1 a aproximadamente 25 aminoácidos, preferiblemente cualquier cantidad entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 aminoácidos, más preferiblemente cualquier cantidad entre aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 aminoácidos, más preferiblemente 13 aminoácidos.

40 **[0033]** Preferiblemente, el enlace comprende o consiste en una secuencia polipeptídica de aminoácidos que carece de cualquier estructura secundaria estable tal como una hélice alfa, hebra beta, hélice 3_{10} y hélice π , hélice de poliprolina, lámina alfa. Preferiblemente, la región de enlace comprende o consiste en una secuencia polipeptídica de aminoácidos que define un polipéptido flexible, dinámico o no estructurado tal como, por ejemplo, un bucle flexible o hélice aleatorio o vuelta flexible. Dichos polipéptidos no estructurados suelen encontrarse en la conexión de regiones de estructura secundaria en moléculas proteicas grandes.

45 **[0034]** Preferiblemente, el enlace es una secuencia polipeptídica de aminoácidos que comprende una cantidad mayor que o aproximadamente de un 50 % de glicina y/o alanina y/o serina en p75NTR(NBP), más preferiblemente mayor que o aproximadamente de un 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de glicina y/o alanina y/o serina en p75NTR(NBP). Preferiblemente, la región de enlace comprende o
 50 consiste en una secuencia polipeptídica de aminoácidos que comprende tanto glicina como serina, preferiblemente con una proporción mayor de glicina que de serina; preferiblemente, la región de enlace comprende o consiste en enlaces flexibles, SEQ ID NO. 17 (GGGG) n ($n = 1$ a 4), o enlaces helicoidales, SEQ ID NO. 18 (EAAAK) n ($n = 2$ a 5) o enlaces polipeptídicos que incluyen principalmente residuos de aminoácidos

seleccionados entre glicina, serina, alanina y treonina que oscilan entre 1 y 10 repeticiones de cada aminoácido y cualquier combinación de los mismos.

5 **[0035]** Preferiblemente, el enlace solventa o evita el impedimento estérico de la molécula auxiliar, que podría interferir con la capacidad de unión a neurotrofina mencionada anteriormente o la actividad biológica de la p75NTR(NBP) en comparación con la p75NTR(NBP) que no está enlazada a una molécula auxiliar. Por lo tanto, la región de enlace preferiblemente permite la flexibilidad entre la p75NTR(NBP) y la molécula auxiliar y permite la retención de la actividad biológica mencionada anteriormente de p75NTR(NBP) o su mejora en comparación con p75NTR(NBP) libre o nativa no enlazada de tal manera, como se determina mediante la unión a neurotrofinas mediante la utilización de ensayos de unión tales como los descritos en el presente documento.

10 **[0036]** Más preferiblemente, el enlace es inmunológicamente inerte, de manera que no provoca lisis mediada por complemento, no estimula la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), no activa las células microglia o T. Preferiblemente, la región de enlace se reduce en una o más de estas actividades.

15 **[0037]** Más preferiblemente, el enlace comprende o consiste en un polipéptido conocido o predicho a partir de análisis estructural o predicción estructural para ser un polipéptido flexible o dinámico o no estructurado o para carecer de una estructura secundaria estable.

[0038] Más preferiblemente, el enlace comprende o consiste en un polipéptido de secuencia de SEQ ID NO. 19 (GGGGS).

20 **[0039]** La p75NTR(NBP) de la invención también puede comprender un sitio de escisión proteolítica, opcionalmente interpuesto entre la p75NTR(NBP) y la molécula auxiliar. El sitio de escisión proteolítica puede situarse en el enlace o en el cruce del enlace con la p75NTR(NBP) o/y la molécula auxiliar. La p75NTR(NBP) puede opcionalmente escindirse de la molécula auxiliar antes de la formulación y/o administración con fines terapéuticos.

[0040] Preferiblemente, el enlace y/o la una o más moléculas auxiliares no perjudican o perjudican considerablemente los siguientes aspectos de la p75NTR(NBP):

25 (a) su efecto en la actividad funcional de las neurotrofinas (definido como modulación o disminución o aumento de la actividad funcional de las neurotrofinas) NGF, BDNF, NT3 o NT4/5.

(b) su afinidad de unión para cualquiera entre NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 con una afinidad de unión de entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 50 nM

30 (c) su capacidad para unirse a cada una de las neurotrofinas NGF, NT3, BDNF y NT4/5, preferiblemente NGF, NT3, BDNF y NT4/5 humanas.

35 **[0041]** Según un modo de realización preferido de los aspectos uno y dos de la presente invención, se da a conocer una p75NTR(NBP) de la presente invención se da a conocer una p75NTR(NBP) para su utilización en el tratamiento del dolor donde la p75NTR(NBP) consiste en: (A) una p75NTR(NBP) de secuencia SEQ ID NO. 3, y opcionalmente (B) una inmunoglobulina Fc, y también opcionalmente consiste en la secuencia SEQ ID NO. 11 y opcionalmente (C) un enlace, que consiste opcionalmente en la SEQ ID NO. 19.

– Según un tercer aspecto de la exposición, se da a conocer una molécula de ácido nucleico que codifica la p75NTR(NBP) o p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares según el primer o segundo aspecto. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico se utiliza en el tratamiento del dolor.

40 **[0042]** Según un modo de realización preferido de la presente exposición, la molécula de ácido nucleico también puede comprender una región que codifica una secuencia señal, preferiblemente una secuencia señal de p75NTR, por ejemplo, una secuencia de ADN o ARN.

– Según un cuarto aspecto de la exposición, se da a conocer un vector de expresión replicable para la transfección de una célula, comprendiendo el vector la molécula de ácido nucleico del tercer aspecto; preferiblemente, el vector es un vector viral. Preferiblemente, el vector se utiliza en el tratamiento del dolor.

45 – Todavía según el tercer o el cuarto aspecto de la invención, se da a conocer un método de expresión de la molécula de ácido nucleico o el vector de la invención para producir o secretar la p75NTR(NBP) o p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares. Preferiblemente, el método comprende la introducción de la molécula de ácido nucleico o vector en una célula y la expresión del ácido nucleico que se encuentra allí para producir o secretar la p75NTR(NBP) o p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico o vector se introduce en la célula *in vitro*, de forma alternativa, *in vivo*. Preferiblemente, la p75NTR(NBP) o p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares expresada se expresa *in vitro*, opcionalmente también se aísla y se purifica, de forma alternativa, preferiblemente la p75NTR(NBP) o p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares expresada se expresa *in vivo*, preferiblemente la expresión *in vivo* constituye terapia génica.

Preferiblemente, el vector es un vector de expresión replicable, opcionalmente para la transfección de una célula de mamífero, preferiblemente el vector es un vector viral.

- Según un quinto aspecto de la exposición, se da a conocer una célula huésped que alberga la molécula de ácido nucleico o vector del tercer o el cuarto aspecto; preferiblemente la célula es una célula de mamífero.
- 5 - Según un sexto aspecto de la exposición, se da a conocer la p75NTR(NBP) para su utilización según el primer o segundo aspecto o los modos de realización preferidos de la misma, o el ácido nucleico o vector para su utilización según el tercer y el cuarto aspecto donde el dolor o síntoma de dolor se selecciona entre:
- (a) dolor agudo y/o dolor espontáneo,
 - (b) dolor crónico y/o dolor continuo,
 - 10 (c) dolor inflamatorio que incluye cualquiera entre el dolor de la artritis, el dolor provocado por la osteoartritis o la artritis reumatoide, provocada por enfermedades inflamatorias intestinales, psoriasis y eccema
 - (d) dolor nociceptivo,
 - (e) dolor neuropático, que incluye la neuropatía diabética dolorosa o el dolor asociado a la neuralgia postherpética,
 - 15 (f) hiperalgesia,
 - (g) alodinia,
 - (h) dolor central, dolor central tras un ictus, dolor provocado por esclerosis múltiple, dolor provocado por lesión de la médula espinal o dolor provocado por la enfermedad de Parkinson o epilepsia,
 - 20 (i) dolor provocado por el cáncer,
 - (j) dolor posoperatorio,
 - (k) dolor visceral, incluido el dolor visceral digestivo y el dolor visceral no digestivo, dolor causado por trastornos gastrointestinales (GI), dolor provocado por trastornos intestinales funcionales (FBD, por sus siglas en inglés), dolor provocado por enfermedades intestinales inflamatorias (IBD, por sus siglas en inglés), dolor provocado por dismenorrea, dolor pélvico, cistitis, cistitis intersticial o pancreatitis,
 - 25 (l) dolor musculoesquelético, mialgia, fibromialgia, espondilitis, artropatías seronegativas (no reumatoides), reumatismo no articular, distrofinopatía, glicogenólisis, polimiositis, piomiositis.
 - (m) dolor cardíaco o vascular, dolor provocado por angina, infarto de miocardio, estenosis mitral, pericarditis, fenómeno de Raynaud, escleredoma, escleredoma o isquemia del músculo esquelético,
 - 30 (n) dolor de cabeza incluida la migraña, migraña con aura, migraña sin aura, cefalalgia histaminica, cefalea tensional.
 - (o) dolor orofacial, incluido el dolor dental, dolor miofascial temporomandibular o tinnitus, o
 - (p) dolor de espalda, bursitis, dolor menstrual, migraña, dolor referido, neuralgia del trigémino, hipersensibilización, dolor provocado por trauma espinal y/o degeneración o apopleja.
- 35 - Según un séptimo aspecto de la exposición, se da a conocer la p75NTR(NBP) para su utilización según el primer o segundo aspecto o modos de realización preferidos de la misma, o la molécula de ácido nucleico o vector para su utilización según el tercer y el cuarto aspecto donde la p75NTR(NBP) o la molécula de ácido nucleico o vector se utilizan de forma separada, secuencial o simultánea en una combinación combinada con un segundo compuesto farmacológicamente activo. Preferiblemente, el segundo compuesto farmacológicamente activo de la combinación se selecciona entre:
- 40
- un analgésico opioide, por ejemplo, morfina, heroína, hidromorfona, oximorfona, levorfanol, levalorfanol, metadona, meperidina, fentanilo, cocaína, codeína, dihidrocodeína, oxicodona, hidrocodona, propoxifeno, nalmefero, nalorfina, naloxona, naltrexona, buprenorfina, butorfanol, nalbufina o pentazocina;
 - 45 • un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID, por sus siglas en inglés), por ejemplo, aspirina, diclofenaco, diflusinal, etolodaco, fenfubén, fenoprofeno, flufenisal, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, nimesulida, nitroflurbiprofeno, olsalazina, oxaprozina, fenilbutazona, piroxicam, sulfasalazina, sulindaco, tolmetina o zomepiraco;
 - 50 • un sedante barbitúrico, por ejemplo, amobarbital, aprobarbital, butabarbital, butabital, mefobarbital, metarbitol, metohexital, pentobarbital, fenobarbital, secobarbital, talbutal, teamilal o triopental;
 - una benzodiazepina que tenga una acción sedante, por ejemplo, clordiazepóxido, clorazepato, diazepam, flurazepam, lorazepam, oxazepam, temazepam o triazolam;
 - un antagonista H₁ que tenga una acción sedante, por ejemplo, difenhidramina, pirilamina, prometazina, clorfeniramina o clorciclizina;
 - 55 • un sedante tal como glutetimida, meprobamato, metacualona o dicloralfenazona;
 - un relajante del músculo esquelético, por ejemplo, baclofeno, carisoprodol, clorzoxazona, ciclobenzaprina, metocarbamol u orfenadina;
 - un antagonista de los receptores NMDA, por ejemplo, dextrometorfano ((+)-3-hidroxi-N-metilmorfinano) o su metabolito dextrorfano ((+)-3-hidroxi-N-metilmorfinano), ketamina, memantina, piroloquinolina quinona, ácido cis-4-(fosfonometil)-2-piperidincarboxílico, bupidino, EN-3231 (MorphiDex®, una
 - 60

formulación de combinación de morfina y dextrometorfano), topiramato, neramexano o perzinfotel incluido un antagonista NR2B, por ejemplo, ifenprodil, traxoprodil o (-)-(R)-6-{2-[4-(3-fluorofenil)-4-hidroxi-1-piperidinil]-1-hidroxietil-3,4-dihidro-2(1H)-quinolinona};

- 5 • un alfa adrenérgico, por ejemplo, doxazosina, tamsulosina, clonidina, guanfacina, dexmetatomidina, modafinilo o 4-amino-6,7-dimetoxi-2-(5-metano-sulfonamido-1,2,3,4-tetrahidroisoquinol-2-il)-5-(2-piridil)quinazolina;
- un antidepresivo tricíclico, por ejemplo, desipramina, imipramina, amitriptilina o nortriptilina;
- un anticonvulsivo, por ejemplo, carbamazepina, lamotrigina, topiramato o valproato;
- 10 • un antagonista de taquiciclina (NK), en particular, un antagonista NK-3, NK-2 o NK-1, por ejemplo, (α R,9R)-7-[3,5-bis(trifluorometil)bencil]-8,9,10,1-tetrahidro-9-metil-5-(4-metilfenil)-7H-[1,4]diazocino[2,1-g][1,7]-naftiridina-6-13-diona (TAK-637), 5-[[[(2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etoxi-3-(4-fluorofenil)-4-morfolinil]-metil]-1,2-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-ona (MK-869), aprepitant, lanepitant, dapitant o 3-[[2-metoxi-5-(trifluorometoxi)fenil]-metiolamino]-2-fenilpiperidina (2S,3S);
- 15 • un antagonista muscarínico, por ejemplo, oxibutinina, tolterodina, propiverina, cloruro de trospio, darifenacina, solifenacina, temiverina e ipratropio;
- un inhibidor selectivo de la COX-2, por ejemplo, celecoxib, rofecoxib, parecoxib, valdecoxib, deracoxib, etoricoxib o lumiracoxib;
- un analgésico de alquitrán de hulla, en particular paracetamol;
- 20 • un neuroléptico tal como droperidol, clorpromazina, haloperidol, perfenazina, tioridazina, mesoridazina, trifluoperazina, flufenazina, clozapina, olanzapina, risperidona, ziprasidona, quetiapina, sertindol, aripiprazol, sonepiprazol, blonanserina, iloperidona, perospirona, racloprida, zotepina, bifeprunox, asenapina, lurasidona, amisulprida, balaperidona, palindore, eplivanserina, osanetant, rimonabant, meclinetant, Miraxion® o sarizotan;
- un agonista de los receptores vaniloideos (p. ej., resiniferatoxina) o un antagonista de los receptores vaniloideos (p. ej., capsazepina);
- 25 • un beta adrenérgico tal como propranolol;
- un anestésico local tal como mexiletina;
- un corticoesteroide tal como dexametasona;
- un agonista o antagonista del receptor 5-HT, en particular un agonista 5-HT_{1B/1D} tal como eletriptán, sumatriptán, zolmitriptán o rizatriptán;
- 30 • un antagonista del receptor 5-HT_{2A} tal como R(+)-alfa-(2,3-dimetoxi-fenil)-1-[2-(4-fluorofeniletíl)]-4-piperidinemetanol (MDL-100907);
- un analgésico colinérgico (nicotínico), tal como ispronocina (TC-1734), (E)-N-metil-4-(3-piridinil)-3-buten-1-amina (RJR-2403), (R)-5-(2-azetidilmetoxi)-2-cloropiridina (ABT-594) o nicotina;
- 35 • Tramadol®;
- un inhibidor de la PDEV, tal como 5-[2-etoxi-5-(4-metil-1-piperazinil-sulfonil)fenil]-1-metil-3-n-propil-1,6-dihidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona (sildenafil), (6R,12aR)-2,3,6,7,12,12a-hexahidro-2-metil-6-(3,4-metilenedioxifenil)-pirazino[2',1':6,1]-pirido[3,4-b]indol-1,4-diona (IC-351 o tadalafilo), 2-[2-etoxi-5-(4-etil-piperazina-1-il-1-sulfonil)-fenil]-5-metil-7-propil-3H-imidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4-ona (vardenafilo), 5-(5-acetil-2-butoxi-3-piridinil)-3-etil-2-(1-etil-3-azetidil)-2,6-dihidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona, 5-(5-acetil-2-propoxi-3-piridinil)-3-etil-2-(1-isopropil-3-azetidil)-2,6-dihidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona, 5-[2-etoxi-5-(4-etilpiperazina-1-ilsulfonil)piridin-3-il]-3-etil-2-[2-metoxietil]-2,6-dihidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona, 4-[(3-cloro-4-metoxibenzil)amino]-2-[(2S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il]-N-(pirimidin-2-ilmetil)pirimidina-5-carboxamida, 3-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-dihidro-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)-N-[2-(1-metilpirrolidin-2-il)etil]-4-propoxibenzenesulfonamida;
- 40 • un cannabinoide;
- antagonista del receptor metabotrópico de glutamato (mGluR1) subtipo 1;
- un inhibidor de la recaptación de serotonina tal como sertralina, metabolito de la sertralina desmetilsertralina, fluoxetina, norfluoxetina (metabolito de desmetil fluoxetina), fluvoxamina, paroxetina, citalopram, metabolito del citalopram desmetilcitalopram, escitalopram, d,l-fenfluramina, femoxetina, ifoxetina, cianodotiepina, litoxetina, dapoxetina, nefazodona, cericlamina y trazodona;
- 45 • inhibidor de la recaptación de noradrenalina (norepinefrina), tal como maprotilina, lofepramina, mirtazepina, oxaprotilina, fezolamina, tomoxetina, mianserina, bupropión, metabolito de bupropión hidroxibupropión, nomifensina y viloxazina (Vivalan®), especialmente un inhibidor de la recaptación de noradrenalina selectivo tal como reboxetina, en particular (S,S)-reboxetina;
- 50 • un inhibidor dual de la recaptación de serotonina y noradrenalina, tal como venlafaxina, metabolito de la venlafaxina O-desmetilvenlafaxina, clomipramina, metabolito de la clomipramina desmetilclomipramina, duloxetina, milnaciprán e imipramina;
- un inhibidor de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, por sus siglas en inglés) tal como ácido S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-L-homocisteína, S-[2-[(1-iminoetil)-amino]etil]-4,4-dioxo-L-cisteína, S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, (2S,5Z)-2-amino-2-metil-7-[(1-iminoetil)amino]-5-heptenoico, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil)-butil]tio]-5-cloro-3-piridinecarbonitrilo; 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-4-clorobenzonitrilo, (2S,4R)-2-amino-4-[[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]tio]-5-
- 55
- 60

tiazolebutanol, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil) butil]tio]-6-(trifluorometil)-3 piridinecarbonitrilo, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-5-clorobenzonitrilo, N-[4-[2-(3-clorobenzilamino)etil]fenil]tio]feno-2-carboxamida, o guanidinoetildisulfuro;

- un inhibidor de la acetilcolinesterasa tal como donepezilo;
- 5 • un antagonista de prostaglandina E₂ subtipo 4 (EP4, por sus siglas en inglés) tal como ácido N-[[2-[4-(2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)fenil]etil]amino]-carbonil]-4-metilbenzenesulfonamida o ácido 4-[(1S)-1-[[5-cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil]amino]etil]benzoico;
- un antagonista de leucotrieno B₄; tal como ácido 1-(3-bifenil-4-ilmetil-4-hidroxi-croman-7-il)-ciclopentanecarboxílico (CP-105696), ácido 5-[2-(2-Carboxietil)-3-[6-(4-metoxifenil)-5E-hexenil]oxifenoxi]-valérico (ONO-4057) o DPC-11870,
- 10 • un inhibidor de la 5-lipoxigenasa, tal como zileutón, 6-[[3-fluoro-5-[4-metoxi-3,4,5,6-tetrahidro-2H-piran-4-il]fenoxi-metil]-1-metil-2-quinolona (ZD-2138), o 2,3,5-trimetil-6-(3-piridilmetil),1,4-benzoquinona (CV-6504);
- un bloqueador de los canales de sodio, tal como lidocaína; o
- 15 • un antagonista 5-HT₃, tal como ondansetrón;

y las sales y solvatos farmacéuticamente aceptables correspondientes.

- Según un octavo aspecto de la presente exposición, se da a conocer un método de tratamiento, prevención, mejora, control y reducción de la incidencia del dolor o de cualquiera de los dolores anteriores y/o síntomas de dolor o de retraso del desarrollo o evolución de los mismos en un individuo, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de la p75NTR(NBP) según el primer, el segundo o el séptimo aspecto o los modos de realización preferidos de la misma o la molécula de ácido nucleico o vector según el tercer y el cuarto aspecto. Preferiblemente, el individuo es un mamífero, por ejemplo un animal de compañía tal como un caballo, gato o perro o un animal de granja tal como una oveja, vaca o cerdo. Más preferiblemente el mamífero es un humano.
- 20
- Según un noveno aspecto de la presente exposición, se da a conocer una composición farmacéutica para uno o más de entre el tratamiento, prevención, mejora, control y reducción de la incidencia del dolor o de cualquiera de los dolores anteriores /o síntomas, o retraso del desarrollo o evolución de los mismos, que comprende la p75NTR(NBP) según el primer, el segundo o el séptimo aspecto o los modos de realización preferidos de la misma o la molécula de ácido nucleico o vector según el tercer y el cuarto aspecto y un portador farmacéuticamente aceptable y/o un excipiente. Preferiblemente, la p75NTR(NBP) según el primer, el segundo o el séptimo aspecto o los modos de realización preferidos de la misma o la molécula de ácido nucleico o vector según el tercer y cuarto aspecto o la composición farmacéutica del noveno aspecto está preparada o es adecuada para la administración por vía oral, sublingual, bucal, tópica, rectal, inhalatoria, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intracardíaca, intraósea, intradérmica, intraperitoneal, transmucosa, vaginal, intravítrea, intraarticular, periarticular, local o epicutánea.
- 25
- 30
- 35

[0043] Preferiblemente, la p75NTR(NBP) según el primer, el segundo o el séptimo aspecto o los modos de realización preferidos de la misma o la molécula de ácido nucleico o vector según el tercer y cuarto aspecto o la composición farmacéutica del noveno aspecto está preparada o es adecuada para la administración antes, y/o durante y/o después del comienzo del dolor o para dicha utilización.

- 40 **[0044]** Preferiblemente, la p75NTR(NBP) según el primer, el segundo o el séptimo aspecto o los modos de realización preferidos de la misma o la molécula de ácido nucleico o vector según el tercer y el cuarto aspecto o la composición farmacéutica del noveno aspecto está prevista o preparada para su administración entre una y 7 veces por semana, más preferiblemente entre una y cuatro veces al mes, más preferiblemente entre una y seis veces por cada periodo de 6 meses, más preferiblemente de una a doce veces al año. Preferiblemente, el medicamento está pensado o está preparado para administrarse de forma secundaria en un periodo seleccionado entre: una vez al día, una vez cada dos, tres, cuatro, cinco o seis días, semanalmente, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, una vez cada siete meses, una vez cada ocho meses, una vez cada nueve meses, una vez cada diez meses, una vez cada once meses o anualmente.
- 45
- 50

- 55 **[0045]** Más preferiblemente, la p75NTR(NBP) según el primer, el segundo o el séptimo aspecto o los modos de realización preferidos de la misma o la molécula de ácido nucleico o vector según el tercer y cuarto aspecto o la composición farmacéutica del noveno aspecto está pensada o está preparada para administrarse de forma secundaria por medio de una vía seleccionada entre una o más de una de las siguientes: oral, sublingual, bucal, tópica, rectal, inhalatoria, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial o intramuscular, intracardíaca, intraósea, intradérmica, intraperitoneal, transmucosa, vaginal, intravítrea, epicutánea, intraarticular, periarticular o local.

[0046] Preferiblemente, la p75NTR(NBP) según el primer, el segundo o el séptimo aspecto o los modos de realización preferidos de la misma o la molécula de ácido nucleico o vector según el tercer y cuarto aspecto o la

composición farmacéutica del noveno aspecto está prevista para o preparada para su administración a una concentración de entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 mg/ml; preferiblemente a cualquiera de aproximadamente 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 mg/ml +/- aproximadamente 10 % de error, más preferiblemente a aproximadamente 50 mg/ml.

[0047] Preferiblemente, la p75NTR(NBP) según el primer, el segundo o el séptimo aspecto o los modos de realización preferidos de la misma o la molécula de ácido nucleico o vector según el tercer y cuarto aspecto o la composición farmacéutica del noveno aspecto está prevista para o preparada para su administración a una concentración de entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal; preferiblemente a cualquiera de aproximadamente 0,5, 1, 5, 10, 10,15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal +/- aproximadamente 10 % de error, más preferiblemente a aproximadamente 10 mg/kg.

– Según un décimo aspecto de la presente exposición, se da a conocer un conjunto que comprende:

(a) la p75NTR(NBP) según el primer, el segundo o el séptimo aspecto o los modos de realización preferidos de la misma o la molécula de ácido nucleico o vector según el tercer y cuarto aspecto o la composición farmacéutica del noveno aspecto; e

(b) instrucciones para la administración de una cantidad eficaz de dicha p75NTR(NBP), molécula de ácido nucleico, vector o composición farmacéutica a un individuo para una o más de entre la prevención o el tratamiento del dolor y/o los síntomas de dolor o para la mejora, el control, la reducción de la incidencia del dolor y/o los síntomas de dolor, o el retraso del desarrollo o evolución de los mismos.

[0048] El conjunto puede incluir uno o más recipientes que contengan la p75NTR(NBP), el ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica descritos en el presente documento e instrucciones para su utilización según cualquiera de los métodos y utilizaciones de la invención. El conjunto también puede comprender una descripción de seleccionar un individuo adecuado para el tratamiento a partir de la identificación de si dicho individuo tiene un dolor o un síntoma de dolor o presenta riesgo de tenerlo. Las instrucciones para la administración de la composición farmacéutica pueden incluir información en cuanto a la dosis, la pauta posológica y las vías de administración para el tratamiento previsto.

[0049] Según un undécimo aspecto de la presente exposición, se da a conocer la p75NTR(NBP) según el primer, el segundo o el séptimo aspecto o los modos de realización preferidos de la misma o la molécula de ácido nucleico o vector según el tercer y cuarto aspecto o la composición farmacéutica del noveno aspecto para su utilización en una o más de entre la prevención o el tratamiento o para la mejora, control, reducción de la incidencia de una enfermedad o los síntomas de una enfermedad asociada a cualquiera una o más de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 o el retraso del desarrollo o evolución de las mismas. - *NGF (factor de crecimiento neurotrófico)* se une a al menos dos clases de receptores: el p75NTR y el TrkA, una tirosina quinasa transmembrana, está relacionado con el crecimiento axonal, la ramificación y la elongación. Se conocen las condiciones y los síntomas asociados al NGF. NGF se expresa en condiciones inflamatorias y en el dolor y se asocia a los mismos [Secuencia de proteínas NP_002497.2, NP_038637]. Además, se ha demostrado que NGF desempeña una función en un número de enfermedades cardiovasculares, tales como aterosclerosis coronaria, obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico, así como en la esclerosis múltiple. Los niveles plasmáticos reducidos de NGF (y también de BDNF) se han asociado a los síndromes coronarios agudos y los síndromes metabólicos. El NGF también está relacionado con diversos trastornos psiquiátricos, tales como la demencia, la depresión, la esquizofrenia, el autismo, el síndrome de Rett, la anorexia nerviosa y la bulimia nerviosa, y se ha relacionado también con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y de trastornos neurodegenerativos. También se ha demostrado que el NGF acelera la cicatrización de heridas y hay pruebas de que podría ser útil en el tratamiento de úlceras cutáneas y úlceras corneales; se ha demostrado que reduce la degeneración neural y estimula la regeneración nerviosa periférica en las ratas.

– *BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro)* es una neurotrofina que ayuda a la supervivencia neuronal y al crecimiento durante el desarrollo del sistema nervioso [Secuencia de proteínas NP_001137277.1, NP_001041604]. BDNF une los receptores de la superficie de la célula TrkB y p75NTR y también modula la actividad del receptor nicotínico alfa 7. Se conocen las condiciones y los síntomas asociados a BDNF. Se ha demostrado que BDNF desempeña una función fundamental en la transmisión de dolor fisiológico y patológico, en particular en modelos de dolor agudo, dolor inflamatorio y dolor neuropático, donde se ha demostrado que la síntesis de BDNF aumenta de forma considerable; también se ha demostrado que BDNF aumenta en condiciones de dolor crónico, así como en condiciones adicionales, tales como eccema y psoriasis. La disminución de BDNF se observa en la depresión, la esquizofrenia, el trastorno obsesivo-compulsivo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, el síndrome de Rett y la demencia, así como en la anorexia nerviosa y la bulimia nerviosa.

– *La neurotrofina-4 (NT-4), también conocida como neurotrofinas-5 (not-5)*, es un factor neurotrófico que señala principalmente a través de los receptores p75NTR y TrkB y estimula la supervivencia de las

neuronas simpáticas sensoriales periféricas. El péptido maduro de esta proteína es idéntico en todos los mamíferos examinados, incluidos los humanos, cerdos, ratas y ratones. [Secuencia de proteínas NP_006170, NP_937833]. La NT-4 se sintetiza mediante la mayoría de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG, por sus siglas en inglés) y de los ganglios simpáticos paravertebrales y prevertebrales, el asta dorsal y ventral espinales, y se encuentra expresada en muchos tejidos incluidos la próstata, el timo, la placenta y el músculo esquelético. Se conocen las condiciones y los síntomas asociados a la NT-4/5. Los defectos en la NT4/5 se asocian a la susceptibilidad al glaucoma primario de ángulo abierto. También se ha demostrado que la neurotrofina 4 contribuye a la supervivencia celular del cáncer de mama y es una diana para inhibir el crecimiento tumoral. Se sabe que la NT-4/5 está relacionada con sistemas de señalización del dolor tales como el dolor nociceptivo; el aumento de NT-4/5 también se observa en condiciones inflamatorias crónicas de la piel, tales como dermatitis, eccema, lesiones de prurigo de dermatitis atópica. La disminución de NT-4/5 se observa en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington.

- La *neurotrofina-3 (NT-3)* es una neurotrofina que está relacionada estructuralmente con beta-NGF, BDNF y NT-4, y que controla la supervivencia y la diferenciación de las neuronas de mamíferos y el mantenimiento del sistema nervioso adulto, y puede afectar al desarrollo de las neuronas en el embrión cuando se expresa en la placenta humana. Se conocen las condiciones y los síntomas asociados a la NT3. Los ratones con deficiencia en NTF3 generados mediante reconocimiento genético muestran defectos de movimiento graves de las extremidades. La NT-3 señala a través de los receptores Trk y estimula el crecimiento y la supervivencia de las células nerviosas y gliales [Secuencia de proteínas NP_001096124.1 y NP_032768]. Las secuencias de aminoácidos de humano, ratón y rata NT-3 son idénticas. Se sabe que la NT3 y su receptor análogo, la tirosina quinasa C (TrkC), modulan el dolor neuropático y el dolor nociceptivo, y el mecanismo de nocicepción y propiocepción, por ejemplo la expresión de NT3 aumenta en las células del DRG pequeñas de animales neuropáticos. La expresión de NT3 también se asocia a neuropatías tales como la polineuropatía diabética y la neuropatía relacionada con el VIH, neuropatía de fibra grande incluida la atrofia. También está relacionada con el desarrollo de la hiperalgesia (una disminución en el umbral de un estímulo nocivo normal), la alodinia (un estímulo no nocivo se convierte en nocivo), y el dolor espontáneo (dolor en ausencia aparente de estímulos) y es un modulador conocido del dolor muscular.

[0050] A continuación, se describirá la invención con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan con fines ilustrativos, no limitativos, de la invención.

- 30 **[0051]** Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención, no para limitarla.

Ejemplos

Ejemplo 1. Detección del complejo neurotrófico-p75NTR(NBP) endógeno en el plasma humano

35 **[0052]** Se empleó un ensayo con la utilización de NGF basado en perlas magnéticas (Millipore Corp; MA) e inmunoprecipitación mediante la utilización de anticuerpo NGF antihumano biotinilado policlonal de oveja (Novus Biologicals; CO) seguido de SISCAPA (Siscapa <http://siscapa.com/home.html>), determinados posteriormente mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas/espectrometría de masas (LC-MS/MS, por sus siglas en inglés) (LLOQ 7 pg/ml), con el fin de proporcionar pruebas directas de la existencia de un complejo p75NTR/NGF en el plasma humano. El anticuerpo antiNGF policlonal se utilizó para cuantificar el NGF libre en el suero/plasma humano.

40 **[0053]** Las secuencias peptídicas (CAYGYYQDETTGR (SEQ ID NO. 4) VCEAGSGLVFSCQDK (SEQ ID NO. 6) WADAECEEIPGR (SEQ ID NO. 7)) del dominio extracelular de p75NTR (como se muestra en la fig. 2) se seleccionaron como patrones de p75NTR mediante LC-MS/MS tras la digestión de la quimera de p75NTR. La coimmunoprecipitación de p75NTR detectada en el ensayo de NGF total (como se describe anteriormente) fue capaz de demostrar la presencia de los péptidos de control de p75NTR, lo que proporcionó pruebas de un complejo p75-NGF soluble en el suero humano. También se determinaron interacciones similares de p75NTR(NBP) y BDNF, NT-3 y NT4/5 mediante la utilización de coimmunoprecipitación con anticuerpos BDNF, NT-3 y NT4/5 respectivos. Estos ensayos demuestran la presencia de una proteína de unión a p75 neurotrófico soluble en el plasma de humanos unida a NGF, BDNF, NT-3 y NT4/5.

50 **[0054]** Los datos presentados en la figura 2 muestran fragmentos peptídicos estándar de p75NTR(NBP) solubles y la coimmunoprecipitación de p75NTR(NBP) y NGF que demuestran el complejo p75NTR(NBP) -NGF en el plasma humano. A partir de los resultados de los ensayos de coimmunoprecipitación de p75NTR(NBP) -NGF en plasma humano, resulta evidente que los péptidos clave que participan en la unión en el complejo neurotrofina-p75NTR(NBP) son: WADAECEEIPGR (SEQ ID NO. 7), CAYGYYQDETTGR (SEQ ID NO. 4), VCEAGSGLVFSCQDK (SEQ ID NO. 6), adicionalmente, se ha determinado que la secuencia
55 LDSVTSDVVSATEPCKP (SEQ ID NO. 8) también es importante en la unión.

[0055] Los experimentos se repitieron con BDNF y NT-3, y muestran la importancia de las mismas regiones de unión clave de p75NTR(NBP) y demuestran la coimmunoprecipitación de p75NTR(NBP) con BDNF y NT-3, lo que demuestra complejos p75NTR(NBP) -BDNF y p75NTR(NBP) -NT-3 en el plasma humano.

Ejemplo 2. p75NTR(NBP) soluble inhibe la función NGF en la línea celular U20S que expresa TrkA y en la línea celular U20S que coexpresa TrkA y p75NTR.

[0056] Se exploraron los efectos de p75NTR(NBP) en la función NGF en células U20S que expresan TrkA y células U20S que coexpresan TrkA y p75NTR (Discoverx Corp CA). El ensayo se llevó a cabo según la metodología PathHunter (Discoverx Corp CA). En resumen, se compararon las células U20S que expresan TrkA y TrkA+p75NTR de Discoverx Corporation. Las células U20S que expresan TrkA y las células que coexpresan TrkA+p75NTR se colocaron en placas en medio esencial mínimo (MEM; Sigma Aldrich) + 0,5 % suero equino (Sigma Aldrich) a una densidad de 40.000 células/pocillo y se incubaron a 37 °C durante una noche. Se extrajeron las placas de la incubadora 30 minutos antes de su utilización y se almacenaron a temperatura ambiente.

[0057] NGF α (Sigma Aldrich) y p75NTR(NBP) -Fc (p75NTR(NBP) SEQ ID NO. 2 se unen a IgG-Fc SEQ ID NO. 12 mediante el enlace SEQ ID NO 17) o p75NTR(NBP) p75NTR(NBP) SEQ ID NO.2) o p75NTR(NBP) unido a albúmina, SEQ ID NO. 10, o p75NTR(NBP) p75NTR(NBP) SEQ ID NO. 2) unido a transferrina, SEQ ID NO. 9, se diluyeron en tampón de solución de sal equilibrada de Hanks (HBSS Sigma Aldrich) más un 0,25 % de albúmina de suero bovino (ASB). El NGF se diluyó en serie para obtener concentraciones comprendidas entre 0 nM y 200 nM. La p75NTR(NBP) unida a Fc IgG, albúmina o transferrina se diluyó en HBSS para obtener una concentración de p75NTR de 100 ng/ml.

[0058] Se añadieron 5 μ l de cada una de las concentraciones de NGF (0-200 nM) y 5 μ l de p75NTR(NBP) +/- portador a cada pocillo. Con la intención de entender el impacto sobre la preincubación, se incubó p75NTR(NBP) +/- portador y NGF a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de añadir 10 μ l de esta mezcla a cada pocillo. Inmediatamente después de la adición de NGF y p75NTR(NBP) +/- portador, se añadieron 12 μ l de solución de detección (Discoverx Corp CA) a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 60 minutos antes de su lectura en un lector de placas Parkard Victor 2. Se observaron curvas de dosis-respuesta y cambios en las curvas en respuesta a la adición de p75NTR(NBP). Independientemente del portador utilizado, p75NTR(NBP) sin un portador, p75NTR(NBP)-Fc, p75NTR(NBP)-albúmina o p75NTR(NBP)-transferrina, se observaron supresiones y cambios en las curvas de respuesta a la dosis de NGF (véase la figura 4).

Ejemplo 3. p75NTR(NBP) inhibe la función BDNF en la línea celular U20S que expresa TrkB y en la línea celular U20S que coexpresa TrkB y p75NTR.

[0059] Se exploraron los efectos de p75NTR(NBP) en la función BDNF en células U20S que expresan TrkB y células U20S que coexpresan TrkB y p75NTR (Discoverx Corp CA). El ensayo se llevó a cabo según la metodología PathHunter (Discoverx Corp CA). En resumen, se compararon las células U20S que expresan TrkB y TrkB+p75NTR de Discoverx Corporation. Las células U20S que expresan TrkB y las células que coexpresan TrkB+p75NTR se colocaron en placas en medio esencial mínimo (MEM; Sigma Aldrich) + 0,5 % suero equino (Sigma Aldrich) a una densidad de 40.000 células/pocillo y se incubaron a 37 °C durante una noche. Se extrajeron las placas de la incubadora 30 minutos antes de su utilización y se almacenaron a temperatura ambiente.

[0060] BDNF α (Sigma Aldrich) y p75NTR(NBP) -Fc (p75NTR(NBP) SEQ ID NO. 2 se unen a IgG-Fc SEQ ID NO. 12 mediante el enlace SEQ ID NO 17) o p75NTR(NBP) p75NTR(NBP) SEQ ID NO. 2), o p75NTR(NBP) unido a albúmina, SEQ ID NO. 10, o p75NTR(NBP) p75NTR(NBP) SEQ ID NO. 2) unido a transferrina, SEQ ID NO. 9, se diluyeron en tampón de solución de sal equilibrada de Hanks (HBSS Sigma Aldrich) más un 0,25 % de albúmina de suero bovino (ASB). El BDNF se diluyó en serie para obtener concentraciones comprendidas entre 0 nM y 200 nM. La p75NTR(NBP) unida a Fc-IgG, albúmina o transferrina se diluyó en HBSS para obtener una concentración de p75NTR(NBP) de 100 ng/ml.

[0061] Se añadieron 5 μ l de cada una de las concentraciones de BDNF (0-200 nM) y 5 μ l de p75NTR(NBP) +/- portador a cada pocillo. Con la intención de entender el impacto sobre la preincubación, se incubó p75NTR(NBP) +/- portador y BDNF a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de añadir 10 μ l de esta mezcla a cada pocillo. Inmediatamente después de la adición de BDNF y p75NTR(NBP) +/- portador, se añadieron 12 μ l de solución de detección (Discoverx Corp CA) a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 60 minutos antes de su lectura en un lector de placas Parkard Victor 2. Se observaron curvas de dosis-respuesta y cambios en las curvas en respuesta a la adición de p75NTR(NBP). Independientemente del portador utilizado, p75NTR(NBP) sin un portador, p75NTR(NBP)-Fc, p75NTR(NBP)-albúmina o p75NTR(NBP)-transferrina, se observaron supresiones y cambios en las curvas de respuesta a la dosis de BDNF (véase la figura 5).

[0062] Ejemplo 4. Datos de Biocore que demuestran la unión de p75NTR(NBP) a BDNF y la competencia entre antiBDNF y p75NTR(NBP). Se diluyó P75-Fc (p75NTR(NBP)-Fc), (500 μ g/ml) a una concentración de 25 μ g/ml en 10 mM de acetato pH 5,0 y se inmovilizó en el chip de Biocore mediante la utilización del tampón del análisis HBS-P (0,005 % P20) + 1 mg/ml de ASB. Se preparó una solución madre de BDNF (de los sistemas R y D) 2 μ M en tampón HBS-P (0,0005 % P20) + 1 mg/ml de ASB. El experimento de competencia de BDNF se llevó a cabo con p75 y presencia o ausencia de MAB248 (anticuerpo BDNF sistemas R y D) con las siguientes concentraciones: i) MAB248 (500 nM) sólo, ii) BDNF (20 nM) + MAB248 (500 nM) iii) BDNF (20 nM) sólo y iv)

BDNF (20 nM) + MAB248 (100 nM). Todas las muestras se prepararon a partir de soluciones madre y se diluyeron en el tampón del análisis; HBS-P (0,005 % P20) + 1 mg/ml de ASB. Todas las muestras se reservaron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la inyección. Se inició un sensograma manual a través del chip de biocore a una velocidad de flujo de 50 ul/min. Se inyectó cada muestra durante 30 segundos en el orden
5 indicado anteriormente en un ciclo de sensograma distinto. Se llevó a cabo la regeneración en los casos necesarios con 5 mM de NaOH durante un ciclo de 12 segundos (10 ul). Como se muestra en la figura 6 p75NTR(NBP) se une a BDNF.

Ejemplo 5. Inhibición p75NTR(NBP) de actividad NGF en células PC12

[0063] Se demostró que p75NTR(NBP) inhibe considerablemente la actividad de NGF en células PC-12 y N2OS que expresan TrkA y/o TrkB más p75 en la superficie celular, figura 7.

[0064] Las células PC12 de paso bajo (número de paso 20-24) se cultivaron directamente en placas de 96 pocillos en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) suplementadas con un 5 % de suero fetal bovino y un 10 % de suero equino inactivado mediante calor y de penicilina-estreptomicina (10 U/ ml-0,1 mg/ml), y se incubaron en atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂, a 37 °C. Se añadió NGF (50 ng/ml) al medio de crecimiento para diferenciar las células PC12. Se añadió una concentración de dosis de p75NTR(NBP) de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,1, 1,5, 0,78, 0,39, 0,2, 0,1 ng/ml a cada pocillo a través de la placa. Se incubó la placa a 37 °C durante 24 horas, a lo que siguió una determinación de los números de células mediante un contador de células. Como se muestra en la figura 8, la adición de p75NTR(NBP) a los medios bloqueó de forma considerable la diferenciación de las células PC-12 a su fenotipo axonal. En presencia de NGF, las células PC-12 se diferencian y forman un fenotipo de tipo neuronal. Esto se inhibió de manera dependiente de la dosis en respuesta a p75NTR(NBP). Se concluyó a partir de estos ensayos que la p75NTR(NBP) bloquea la acción de NGF.

Ejemplo 6. La proteína de unión neurotrófica p75NTR(NBP) inhibe el efecto de BDNF en la hiperalgesia mecánica en un modelo de excitabilidad de los nervios.

[0065] Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley macho con isoflurano (5 % de oxígeno para la inducción, 1,5 - 2,0 % en oxígeno para el mantenimiento). La médula espinal se expuso a laminectomía lumbar para descubrir la región L4 - L6 de la médula, y un microelectrodo de tungsteno insertado en el asta dorsal para registrar desde una neurona de rango dinámico amplio aislada. Las neuronas individuales WDR se aislaron de manera que la amplitud de potencial de acción de la unidad registrada fuera al menos 3 veces el nivel del ruido del punto de referencia. Se amplificaron las respuestas mediante la utilización de un amplificador neurolog acoplado a CA y se registraron mediante la utilización del *software* CED spike2. Antes de la aplicación del fármaco, se obtuvieron 3 respuestas de punto de referencia estables (<10 % de variación) a un rango de estímulos naturales (roce, von Frey, pellizco y calor). El estímulo de roce se aplicó acariciando el centro del campo receptivo periférico con una brizna delgada de algodón. Se aplicaron el filamento de von Frey y calor (mediante la utilización de un chorro de agua constante a 43 grados) durante un periodo de 10 segundos. Se aplicó un pellizco durante un periodo de 5 segundos. Una vez se obtuvieron las respuestas de puntos de referencia estables, se aplicó BDNF sólo (500 ng en 0,1 % de ASB) o BDNF (500 ng) + p75NTR(NBP) (500 ng preincubado durante 40 minutos antes de la inyección) al centro del campo receptivo en un volumen de 25 ul mediante la utilización de una jeringa para insulina. Se hizo un seguimiento de los efectos del fármaco durante 150 minutos y se llevaron a cabo pruebas en intervalos de 10 min. Al término del experimento se sacrificó la rata mediante dislocación cervical.

[0066] Como se demuestra en la figura 8, BDNF provocó un aumento considerable en la excitabilidad neuronal y esto se amplificó después de estímulos. La adición de p75NTR(NBP) redujo de forma considerable la excitabilidad neuronal en respuesta a todos los estímulos; salino, BDNF, roce y pellizco. Resulta evidente que la p75NTR(NBP) reduce la excitabilidad neuronal y el dolor consiguiente.

Ejemplo 7. La proteína de unión neurotrófica p75NTR(NBP) inhibe la hiperalgesia en un modelo UVIH

Exposición de animales a UV

[0067] Se anestesiaron ratas Sprague Dawley Charles River (175-200 g) con una mezcla al 2 % de isoflurano O₂. Se mantuvo la anestesia a través de una cápsula nasal al tiempo que se irradiaba la superficie plantar de la pata trasera derecha con 300 mJ/cm² de UV (Saalmann CupCube system, Saalmann GmbH, Alemania; λ=280-400 nm). La fuente de irradiación se adaptó a la superficie plantar de la pata trasera de la rata con la utilización del collar de liberación conformado (8x12 mm), conectado a la fuente de UV (equipo de administración e ingeniería de las instalaciones Pfizer). Se calibró la intensidad de las fuentes de UV mediante la utilización del radiómetro ABLE 1400A con el filtro SEL005/WBS320/TD (ABLE Instruments and Controls Ltd). La exposición a UV utilizada provoca eritema cutáneo en ratas ingenuas, pero ningún otro acontecimiento adverso (ninguna pérdida de peso corporal, ningún signo de estrés ni de malestar obvio).

Evaluación de la hiperalgesia térmica

[0068] Se evaluó la hiperalgesia térmica mediante la prueba plantar en ratas (Ugo Basile, Italia) a lo que siguió un método modificado de Hargreaves *et al* (1988). Antes de la prueba, las ratas se habituaron al aparato (15-30 min). La prueba plantar consistió en tres cajas de metracrilato individuales sobre una mesa de vidrio elevada. Se alojaron dos ratas en cada caja de modo que pudieran someterse a prueba 6 ratas por aparato.

5 **[0069]** Se aplicó una fuente de calor por infrarrojos móvil directamente por debajo de la superficie plantar de la pata trasera de la rata. La latencia de retirada de la pata (PWL, por sus siglas en inglés) se definió como el tiempo (segundos) que tarda la rata en apartar la pata trasera de la fuente de calor. Se calibró la fuente para obtener una respuesta de 8-12 segundos en animales sin tratar (105-120 mW/cm²). Se estableció un punto límite automático de 20 segundos para evitar el daño tisular.

10 **[0070]** Se tomaron cinco registros de cada pata trasera de las ratas durante mediciones de punto de referencia (ratas ingenuas antes de las exposiciones a UV, día 0) y la confirmación del inicio de la hiperalgesia (días 1). Se llevaron a cabo dos sesiones al día el día 0 y el día 1.

[0071] Se recogieron tres registros por pata en su lugar para los puntos de referencia y cada punto de prueba durante la evaluación de la eficacia de los medicamentos el día 2, 3 y 4 (48, 72 y 96 horas tras la exposición a UV, respectivamente). Las patas ilesas se evaluaron siempre en primer lugar.

15 **[0072]** La hiperalgesia térmica se define como los animales que muestran PWL \geq 5 seg. débil, que se seleccionan para los ensayos.

Evaluación de la alodinia estática

20 **[0073]** Los animales se habitúan al fondo de alambre de las jaulas de ensayo antes de la evaluación de la alodinia. Los animales se familiarizan con los pelos de von Frey mediante la aplicación de filamento de 15 g, 8 g + 4 g en el primer día de habituación, 4 g de filamento en el segundo día antes de que se lleve a cabo una medición completa de arriba abajo. La alodinia estática se evalúa mediante la aplicación de pelos de von Frey (Stoelting, Wood Dale, Illinois, EE.UU) en orden ascendente de fuerza (0,6, 1, 1,4, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 26 gramos) a la superficie plantar de las patas traseras. Cada pelo de von Frey se aplica a la pata durante un máximo de 6 segundos o hasta que se dé una respuesta de retirada. Una vez se haya establecido una respuesta de retirada a un pelo de von Frey, la pata se vuelve a someter a prueba, empezando con el filamento por debajo de la que se retiró y, posteriormente, con los filamentos restantes en secuencia de fuerza descendente hasta que no se dé ninguna retirada. La fuerza más alta de 26 g levanta la pata y provoca una respuesta, lo que representa el punto límite. Las patas traseras de cada animal se someten a prueba de este modo. La cantidad más baja de fuerza requerida para provocar una respuesta se registra como el umbral de retirada de la pata (PWT, por sus siglas en inglés) en gramos. La alodinia estática se define como presente si los animales responden a un estímulo de 4 g o menor, que es inocuo en ratas normales.

30 **[0074]** Los animales se marcan antes de someterse a prueba y los que muestran alodinia que coincida con los criterios de inclusión se aleatorizan a partir de la PWL y se les administra dosis. El compuesto de ensayo se dosifica y en momentos predeterminados (en función de las propiedades farmacocinéticas del compuesto de ensayo), después de la dosificación, se llevan a cabo mediciones en momentos seleccionados, después de la dosificación y se recogen todos los datos para su análisis. Como se demuestra en la figura 9, los datos de la PWL para la p75NTR(NBP) 10 mg/kg de forma subcutánea (NBPP-Fc indicada) se muestran en comparación con control, ibuprofeno, 100 mg/kg po y anticuerpo antiNGF 10 mg/kg de forma subcutánea; los datos para la evaluación de la hiperalgesia térmica mostraron medidas equivalentes en cada caso.

Citas

[0075]

Armour KL, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM. 1999. Recombinant human IgG molecules lacking Fc γ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol.* 29(8):2613-24.

45 Barthel C, Yeremenko N, Jacobs R, Schmidt RE, Bernateck M, Zeidler H, Tak PP, Baeten D, Rihl M. 2009. Nerve growth factor and receptor expression in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther.* 11:R82. Bothwell MA, Shooter EM. 1977. Dissociation equilibrium constant of beta nerve growth factor. *J Biol Chem* 252:8532-8536.

50 Chu C, Levine E, Gear RW, Bogen O, Levine JD. 2011. Mitochondrial dependence of nerve growth factor-induced mechanical hyperalgesia. *Pain.* 152:1832-7.

Cirillo G, Cavaliere C, Bianco MR, De Simone A, Colangelo AM, Sellitti S, Alberghina L, Papa M. 2010. Intrathecal NGF administration reduces reactive astrogliosis and changes neurotrophin receptors expression pattern in a rat model of neuropathic pain. *Cell Mol Neurobiol.* 30:51-62.

- Cowan, W.M. 2001. Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: the path to the discovery of nerve growth factor. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:551-600.
- 5 Fukui Y, Ohtori S, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Suzuki M, Orita S, Eguchi Y, Ochiai N, Kishida S, Takaso M, Wakai K, Hayashi Y, Aoki Y, Takahashi K. 2010. Low affinity NGF receptor (p75 neurotrophin receptor) inhibitory antibody reduces pain behavior and CGRP expression in DRG in the mouse sciatic nerve crush model. *J Orthop Res.* 2010; 28:279-83.
- 10 Ghilardi JR, Freeman KT, Jimenez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, Bouhana KS, Trollinger D, Winkler J, Lee P, Andrews SW, Kuskowski MA, Mantyh PW. 2010. Sustained blockade of neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC reduces non-malignant skeletal pain but not the maintenance of sensory and sympathetic nerve fibers. *Bone.* 48:389-98.
- Hayashi K, Ozaki N, Kawakita K, Itoh K, Mizumura K, Furukawa K, Yasui M, Hori K, Yi SQ, Yamaguchi T, Sugiura Y. 2011. Involvement of NGF in the Rat Model of Persistent Muscle Pain Associated With Taut Band. *J Pain.* 12:1059-68.
- 15 He XL, Garcia KC. 2004. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304:870-875.
- Huang EJ, Reichardt LF. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 72:609-42
- Huang YZ, Pan E, Xiong ZQ, McNamara JO. 2008. Zinc- mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. *Neuron* 57:546-558.
- 20 Iwakura N, Ohtori S, Orita S, Yamashita M, Takahashi K, Kuniyoshi K. 2010. Role of low-affinity nerve growth factor receptor inhibitory antibody in reducing pain behavior and calcitonin gene-related Peptide expression in a rat model of wrist joint inflammatory pain. *J Hand Surg Am.* 35:267-73.
- Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, et al. 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47:545-554.
- 25 Jung KM, Tan S, Landman N, Petrova K, Murray S, Lewis R, Kim PK, et al. 2003. Regulated intra-membrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J Biol Chem* 278:42161-42169.
- 30 Kanning KC, Hudson M, Amieux PS, Wiley JC, Bothwell M, Schecterson LC. 2003. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* 23:5425-5436.
- Kenchappa RS, Zampieri N, Chao MV, Barker PA, Teng HK, Hempstead BL, Carter BD. 2006. Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* 50:219-232.
- 35 McDonald CL, Bandtlow C, Reindl M. 2011. Targeting the Nogo receptor complex in diseases of the central nervous system. *Curr Med Chem.* 18:234-44.
- Orita S, Ohtori S, Nagata M, Horii M, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Suzuki M, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Ishikawa T, Miyagi M, Ochiai N, Kishida S, Takaso M, Aoki Y, Takahashi K. 2010. Inhibiting nerve growth factor or its receptors downregulates calcitonin gene-related peptide expression in rat lumbar dorsal root ganglia innervating injured intervertebral discs. *J Orthop Res.* Dec; 28:1614-20.
- 40 Pezet S, Onténiente B, Jullien J, Junier MP, Grannec G, Rudkin BB, Calvino B. 2010. Differential regulation of NGF receptors in primary sensory neurons by adjuvant-induced arthritis in the rat. *Pain.* 90:113-25.
- Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM. 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* 325:593-597.
- 45 Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Atkuri KR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. 2011. Nerve growth factor: A key local regulator in the pathogenesis of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011 Jul 26.
- Svensson P, Wang MW, Dong XD, Kumar U, Cairns BE. 2010. Human nerve growth factor sensitizes masseter muscle nociceptors in female rats. *Pain.* Mar; 148:473-80.
- Tria MA, Fusco M, Vantini G, Mariot R. 1994. Pharmacokinetics of nerve growth factor (NGF) following different routes of administration to adult rats. *Exp Neurol.* 127(2): 178-83

Truzzi F, Marconi A, Atzei P, Panza MC, Lotti R, Dallaglio K, Tiberio R, Palazzo E, Vaschieri C, Pincelli C. 2011. p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes. *Cell Death Differ.* Jun;18:948-58.

5 Ueda K, Hirose M, Murata E, Takatori M, Ueda M, Ikeda H, Shigemi K. 2010. Local administration of a synthetic cell-penetrating peptide antagonizing TrkA function suppresses inflammatory pain in rats. *J Pharmacol Sci.*;112:438-43.

Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Reversi A, Klos-Applequist JM, Karaca E, Simi A, et al. 2009a. Ligand-independent signaling by disulfide-crosslinked dimers of the p75 neurotrophin receptor. *J Cell Sci* 122:3351-3357.

10 Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Simi A, Karaca E, Reversi A, Choi S. 2009b. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* 62:72-83.

Watanabe T, Ito T, Inoue G, Ohtori S, Kitajo K, Doya H, Takahashi K, Yamashita T. 2010. The p75 receptor is associated with inflammatory thermal hypersensitivity. *J Neurosci Res.* 2008 Dec; 86:3566-74

15 Yamaoka J, Di ZH, Sun W, Kawana S. 2007. Changes in cutaneous sensory nerve fibers induced by skin-scratching in mice. *J Dermatol Sci.* Apr;46(1):41-51

LISTA DE SECUENCIAS

[0076]

- <110> LEVICEPT LTD
- 20 <120> USO TERAPÉUTICO DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A NEUROTROFINA P75NTR
- <130> LEVI01102WO.e1
- <150> 60/610,682
- < 151> 2012-03-14
- <160> 19
- 25 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- < 211> 427
- < 212> PRT
- < 213> Homo sapiens
- 30 <400> 1

ES 2 637 341 T3

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
 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

ES 2 637 341 T3

<400> 2

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
 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
 245 250

<210> 3

5

<211> 221

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 637 341 T3

<400> 3

Lys Glu Ala Cys Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys
 1 5 10 15

Lys Ala Cys Asn Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn
 20 25 30

Gln Thr Val Cys Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val
 35 40 45

Val Ser Ala Thr Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu
 50 55 60

Gln Ser Met Ser Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg
 65 70 75 80

Cys Ala Tyr Gly Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala
 85 90 95

Cys Arg Val Cys Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp
 100 105 110

Lys Gln Asn Thr Val Cys Glu Glu Cys Pro Gly Thr Tyr Ser Asp Glu
 115 120 125

Ala Asn His Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr
 130 135 140

Glu Arg Gln Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu
 145 150 155 160

Glu Ile Pro Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser
 165 170 175

Asp Ser Thr Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln
 180 185 190

Asp Leu Ile Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly
 195 200 205

Ser Ser Gln Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn
 210 215 220

<210> 4

5

< 211> 13

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 4

Cys Ala Tyr Gly Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg
 1 5 10

10

<210> 5

< 211> 49

ES 2 637 341 T3

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 5

Val Cys Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln
1 5 10 15

Asn Thr Val Cys Glu Glu Cys Pro Gly Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala
20 25 30

Asn His Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu
35 40 45

Arg

5

<210> 6

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 6

Val Cys Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys
1 5 10 15

10

<210> 7

< 211> 12

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

15

<400> 7

Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro Gly Arg
1 5 10

<210> 8

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

20

<400> 8

Leu Asp Ser Val Thr Ser Asp Val Val Ser Ala Thr Glu Pro Cys Lys
1 5 10 15

Pro

<210> 9

< 211> 698

25

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 637 341 T3

Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Ala Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
 20 25 30

His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
 35 40 45

Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
 50 55 60

Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr
 65 70 75 80

Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu
 85 90 95

Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr
 100 105 110

Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met
 115 120 125

Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser
 130 135 140

ES 2 637 341 T3

Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu
145 150 155 160

Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser
165 170 175

Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu
180 185 190

Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser
195 200 205

Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
210 215 220

Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp
225 230 235 240

Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu
245 250 255

Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala
260 265 270

Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln
275 280 285

Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe
290 295 300

Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly
305 310 315 320

Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr
325 330 335

Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu
340 345 350

Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His
355 360 365

His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys
370 375 380

Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile
385 390 395 400

ES 2 637 341 T3

Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr
 405 410 415

Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn
 420 425 430

Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val
 435 440 445

Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys
 450 455 460

Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn
 465 470 475 480

Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp
 485 490 495

Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser
 500 505 510

Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn
 515 520 525

Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val
 530 535 540

Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn
 545 550 555 560

Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys
 565 570 575

Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu
 580 585 590

Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr
 595 600 605

Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln
 610 615 620

His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu
 625 630 635 640

Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys
 645 650 655

Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu
 660 665 670

Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser
 675 680 685

Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
 690 695

ES 2 637 341 T3

<210> 10

< 211> 609

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

<400> 10

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175

ES 2 637 341 T3

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu

ES 2 637 341 T3

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 13

<211> 165

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 13

Cys Tyr Thr Leu Leu Leu Leu Thr Thr Pro Ser Trp Val Leu Ser Gln
 1 5 10 15

Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu Thr
 20 25 30

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala Lys
 35 40 45

Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp
 50 55 60

Leu Ala His Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys Ser Tyr Ser Thr Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val
 85 90 95

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Ala Arg Ile Phe Thr Ile Thr Tyr Ser Asn Tyr Val Leu Gln Tyr Tyr
 115 120 125

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 145 150 155 160

Ser Thr Ser Gly Gly
 165

<210> 14

<211> 217

<212> PRT

10

ES 2 637 341 T3

< 213> Homo sapiens

<400> 14

```

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1                    5                      10                      15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20                      25                      30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35                      40                      45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50                      55                      60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65                      70                      75                      80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85                      90                      95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100                     105                     110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115                     120                     125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130                     135                     140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145                     150                     155                     160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165                     170                     175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180                     185                     190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195                     200                     205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210                     215

```

5

<210> 15

< 211> 209

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 15

ES 2 637 341 T3

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 1 5 10 15

Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 20 25 30

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 35 40 45

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 50 55 60

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 65 70 75 80

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 85 90 95

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 100 105 110

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 115 120 125

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 130 135 140

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 145 150 155 160

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 165 170 175

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 180 185 190

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 195 200 205

Ser

- <210> 16
- < 211> 225
- 5 < 212> PRT
- < 213> Homo sapiens
- <400> 16

ES 2 637 341 T3

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro
 1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 20 25 30

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 35 40 45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 50 55 60

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 65 70 75 80

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 85 90 95

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys
 100 105 110

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 115 120 125

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 145 150 155 160

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 165 170 175

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 180 185 190

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 195 200 205

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 210 215 220

Lys
 225

- <210> 17
- < 211> 5
- 5 < 212> PRT
- < 213> Artificial
- <220>
- < 223> Secuencia de enlace
- <220>

ES 2 637 341 T3

< 221> MISC_FEATURE
< 222> (1)..(5)
< 223> (GGGGS) n (n = 3 a 4)
<400> 17
5 Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 18
< 211> 5
< 212> PRT
< 213> Artificial
10 <220>
< 223> Secuencia de enlace
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (1)..(5)
15 < 223> (EAAAK) n (n = 2 a 5)
<400> 18
Glu Ala Ala Ala Lys
1 5
<210> 19
< 211> 5
20 < 212> PRT
< 213> Artificial
<220>
< 223> Secuencia de enlace
<400> 19
25 Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión a neurotrofina p75NTR, donde la p75NTR(NBP) se une a cualquiera de NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 con una afinidad de unión (K_d) de entre 0,1 nM y 50 nM, como se mide mediante resonancia de plasmones superficiales a 20 °C, para su utilización en el tratamiento del dolor.
- 5 2. La p75NTR(NBP) para su utilización según la reivindicación 1 donde, la p75NTR(NBP) comprende
 - (a) p75NTR(NBP) conectada a una o más moléculas auxiliares seleccionadas entre:
 - (a) transferrina o una parte de la misma,
 - (b) albúmina o una parte de la misma,
 - (c) una inmunoglobulina Fc o una parte de la misma,
 - (d) una cadena polimérica de polietilenglicol,
- 10 3. La p75NTR(NBP) para su utilización según la reivindicación 2 donde, la p75NTR(NBP) se conecta a la una o más moléculas auxiliares a través de uno o más enlaces.
4. La p75NTR(NBP) para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la p75NTR(NBP) es una p75NTR(NBP) humana.
- 15 5. La p75NTR(NBP) para su utilización según cualquier reivindicación anterior donde la p75NTR(NBP) comprende uno o más de los dominios de unión a neurotrofina 1 [SEQ ID NO. 4], 2 [SEQ ID NO. 5], 3 [SEQ ID NO. 6], 4 [SEQ ID NO. 7] o 5 [SEQ ID NO. 8].
6. La p75NTR(NBP) para su utilización según cualquier reivindicación anterior donde la p75NTR(NBP) comprende
 - (a) una o más de SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8,
 - (b) SEQ ID NO. 3 o una parte correspondiente que comprende (a), o
 - (c) SEQ ID NO. 2 o una parte correspondiente que comprende (a).
- 20 7. La p75NTR(NBP) para su utilización según las reivindicaciones 2-6 donde el enlace se selecciona entre:
 - (a) un enlace covalente,
 - (b) enlace no covalente,
 - (c) un enlace peptídico,
 - (d) un aminoácido o una pluralidad de aminoácidos que comprende un péptido.
- 25 8. La p75NTR(NBP) para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 donde la p75NTR(NBP) se conecta a más de una molécula auxiliar, opcionalmente cada molécula auxiliar es, bien la misma, bien diferente o una mezcla de la misma y la diferente.
- 30 9. La p75NTR(NBP) para su utilización según la reivindicación 8, donde la más de una molécula auxiliar comprende un multímero de moléculas auxiliares enlazadas a p75NTR(NBP) mediante un enlace, y donde cada molécula puede ser la misma o diferente o una mezcla de la misma y la diferente.
- 35 10. La p75NTR(NBP) para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la p75NTR(NBP) consiste en
 - (a) una p75NTR(NBP) de secuencia SEQ ID No. 3, y opcionalmente
 - (b) una inmunoglobulina Fc, opcionalmente donde la inmunoglobulina Fc se selecciona entre SEQ ID No. 12, 15 y 16, y más opcionalmente
 - (c) un enlace, opcionalmente donde el enlace se selecciona entre SEQ ID No. 17, 18 y 19.
- 40 11. Una proteína de unión a neurotrofina p75NTR, p75NTR(NBP), donde la p75NTR(NBP) comprende uno o más de los dominios de unión a neurotrofina 1 [SEQ ID NO. 4], 2 [SEQ ID NO. 5], 3 [SEQ ID NO. 6], 4 [SEQ ID NO. 7], o 5 [SEQ ID NO. 8] para su utilización en el tratamiento del dolor.
- 45 12. La p75NTR(NBP) para su utilización según la reivindicación 11 donde la p75NTR(NBP) comprende
 - (a) una o más de SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8,
 - (b) SEQ ID NO. 3 o una parte correspondiente que comprende (a), o
 - (c) SEQ ID NO. 2 o una parte correspondiente que comprende (a).
13. La p75NTR(NBP) para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el dolor o síntoma de dolor se selecciona entre:

- 5 (a) dolor agudo y/o dolor espontáneo,
 (b) dolor crónico y/o dolor continuo,
 (c) dolor inflamatorio que incluye cualquiera entre el dolor de la artritis, el dolor provocado por la osteoartritis o la artritis reumatoide, provocado por enfermedades inflamatorias intestinales,
 (d) dolor nociceptivo,
 (e) dolor neuropático, que incluye la neuropatía diabética dolorosa o el dolor asociado a la neuralgia postherpética,
 (f) hiperalgesia,
 (g) alodinia,
 10 (h) dolor central, dolor central tras un ictus, dolor provocado por la esclerosis múltiple, dolor provocado por lesión de la médula espinal o dolor provocado por la enfermedad de Parkinson o la epilepsia,
 (i) dolor provocado por el cáncer,
 (j) dolor posoperatorio,
 15 (k) dolor visceral, incluido el dolor visceral digestivo y el dolor visceral no digestivo, dolor causado por trastornos gastrointestinales (GI), dolor provocado por trastornos intestinales funcionales (FBD), dolor provocado por enfermedades intestinales inflamatorias (IBD), dolor provocado por dismenorrea, dolor pélvico, cistitis, cistitis intersticial o pancreatitis,
 (l) dolor musculoesquelético, mialgia, fibromialgia, espondilitis, artropatías seronegativas (no reumatoides), reumatismo no articular, distrofinopatía, glicogenólisis, polimiositis, piomiositis,
 20 (m) dolor cardíaco o vascular, dolor provocado por angina, infarto de miocardio, estenosis mitral, pericarditis, fenómeno de Raynaud, escleredoma, escleredoma o isquemia del músculo esquelético,
 (n) dolor de cabeza incluida la migraña, migraña con aura, migraña sin aura, cefalalgia histamínica, cefalea tensional.
 25 (o) dolor orofacial, incluido el dolor dental, dolor miofascial temporomandibular o tinnitus, o
 (p) dolor de espalda, bursitis, dolor menstrual, migraña, dolor referido, neuralgia del trigémino, hipersensibilización, dolor provocado por trauma espinal y/o degeneración o apoplejía.

30 **14.** La p75NTR(NBP) para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la p75NTR(NBP) es para utilización separada, secuencial o simultánea en una combinación combinada con un segundo compuesto farmacológicamente activo, preferiblemente donde el segundo compuesto farmacológicamente activo de la combinación se selecciona entre;

- 35 • un analgésico opioide, por ejemplo, morfina, heroína, hidromorfona, oximorfona, levorfanol, levalorfanol, metadona, meperidina, fentanilo, cocaína, codeína, dihidrocodeína, oxicodona, hidrocodona, propoxifeno, nalmefeno, nalorfina, naloxona, naltrexona, buprenorfina, butorfanol, nalbufina o pentazocina;
- 40 • un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), por ejemplo, aspirina, diclofenaco, diflusal, etolodaco, fenfubén, fenoprofeno, flufenisal, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, nimesulida, nitroflurbiprofeno, olsalazina, oxaprozina, fenilbutazona, piroxicam, sulfasalazina, sulindaco, tolmetina o zomepiraco;
- 45 • un sedante barbitúrico, por ejemplo, amobarbital, aprobarbital, butabarbital, butabital, mefobarbital, metarbital, metohexital, pentobarbital, fenobarbital, secobarbital, talbutal, teamilal o triopental;
- 50 • una benzodiazepina que tenga una acción sedante, por ejemplo, clordiazepóxido, clorazepato, diazepam, flurazepam, lorazepam, oxazepam, temazepam o triazolam;
- un antagonista H₁ que tenga una acción sedante, por ejemplo, difenhidramina, pirlamina, prometazina, clorfeniramina o clorciclizina;
- 55 • un sedante tal como glutetimida, meprobamato, metacualona o dicloralfenazona;
- un relajante del músculo esquelético, por ejemplo, baclofeno, carisoprodol, clorzoxazona, ciclobenzaprina, metocarbamol u orfenadina;
- un antagonista de los receptores NMDA, por ejemplo, dextrometorfano ((+)-3-hidroxi-N-metilmorfinano) o su metabolito dextrorfano ((+)-3-hidroxi-N-metilmorfinano), ketamina, memantina, pirroloquinolina quinona, ácido cis-4-(fosfonometil)-2-piperidinecarboxílico, bupidino, EN-3231 (MorphiDex®), una formulación de combinación de morfina y dextrometorfano), topiramato, neramexano o perzinfotel incluido un antagonista NR2B, por ejemplo, ifenprodil, traxoprodil o (-)-(R)-6-{2-[4-(3-fluorofenil)-4-hidroxi-1-piperidinil]-1-hidroxietil-3,4-dihidro-2(1H)-quinolinona};
- 60 • un alfa adrenérgico, por ejemplo, doxazosina, tamsulosina, clonidina, guanfacina, dexmetatomidina, modafinilo o 4-amino-6,7-dimetoxi-2-(5-metano-sulfonamido-1,2,3,4-tetrahidroisoquinol-2-il)-5-(2-piridil) quinazolina;
- un antidepresivo tricíclico, por ejemplo, desipramina, imipramina, amitriptilina o nortriptilina;
- un anticonvulsivo, por ejemplo, carbamazepina, lamotrigina, topiramato o valproato;

- 5 • un antagonista de taquicinia (NK), en particular, un antagonista NK-3, NK-2 o NK-1, por ejemplo, (α R,9R)-7-[3,5-bis(trifluorometil)bencil]-8,9,10,11-tetrahidro-9-metil-5-(4-metilfenil)-7H-[1,4]diazocino[2,1-g][1,7]-naftiridina-6-13-diona (TAK-637), 5-[[[(2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etoxi-3-(4-fluorofenil)-4-morfolinil]-metil]-1,2-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-ona (MK-869), aprepitant, lanepitant, dapitant o 3-[[2-metoxi-5-(trifluorometoxi)fenil]-metiolamino]-2-fenilpiperidina (2S,3S);
- 10 • un antagonista muscarínico, por ejemplo, oxibutinina, tolterodina, propiverina, cloruro de trospio, darifenacina, solifenacina, temiverina e ipratropio;
- un inhibidor selectivo de la COX-2, por ejemplo, celecoxib, rofecoxib, parecoxib, valdecoxib, deracoxib, etoricoxib o lumiracoxib;
- un analgésico de alquitrán de hulla, en particular paracetamol;
- un neuroléptico tal como droperidol, clorpromazina, haloperidol, perfenazina, tiordazina, mesoridazina, trifluoperazina, flufenazina, clozapina, olanzapina, risperidona, ziprasidona, quetiapina, sertindol, aripiprazol, sonopiprazol, blonanserina, iloperidona, perospirona, racloprida, zotepina, bifeprunox, asenapina, lurasidona, amisulprida, balaperidona, palindore, eplivanserina, osanetant, rimonabant, meclinetant, Miraxion® o sarizotan;
- 15 • un agonista de los receptores vaniloideos (p. ej., resiniferatoxina) o un antagonista de los receptores vaniloideos (p. ej., capsazepina);
- un beta adrenérgico tal como propranolol;
- 20 • un anestésico local tal como mexiletina;
- un corticoesteroide tal como dexametasona;
- un agonista o antagonista del receptor 5-HT, en particular un agonista 5-HT_{1B/1D} tal como eletriptán, sumatriptán, zolmitriptán o rizatriptán;
- 25 • un antagonista del receptor 5-HT_{2A} tal como R(+)-alfa-(2,3-dimetoxi-fenil)-1-[2-(4-fluorofeniletil)]-4-piperidinemetanol (MDL-100907);
- un analgésico colinérgico (nicotínico), tal como ispronidina (TC-1734), (E)-N-metil-4-(3-piridinil)-3-buten-1-amina (RJR-2403), (R)-5-(2-azetidilmetoxi)-2-cloropiridina (ABT-594) o nicotina;
- Tramadol®;
- 30 • un inhibidor de la PDEV, tal como 5-[2-etoxi-5-(4-metil-1-piperazinil-sulfonil)fenil]-1-metil-3-n-propil-1,6-dihidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona (sildenafil), (6R,12aR)-2,3,6,7,12,12a-hexahidro-2-metil-6-(3,4-metilenedioxifenil)-pirazino[2',1':6,1]-pirido[3,4-b]indol-1,4-diona (IC-351 o tadalafil), 2-[2-etoxi-5-(4-etil-piperazina-1-il-1-sulfonil)-fenil]-5-metil-7-propil-3H-imidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4-ona (vardenafilo), 5-(5-acetil-2-butoxi-3-piridinil)-3-etil-2-(1-etil-3-azetidil)-2,6-dihidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona, 5-(5-acetil-2-propoxi-3-piridinil)-3-etil-2-(1-isopropil-3-azetidil)-2,6-dihidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona, 5-[2-etoxi-5-(4-etilpiperazina-1-ilsulfonil)piridin-3-il]-3-etil-2-[2-metoxietil]-2,6-dihidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona, 4-[(3-cloro-4-metoxibenzil)amino]-2-[(2S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il]-N-(pirimidin-2-ilmetil)pirimidina-5-carboxamida, 3-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-dihidro-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)-N-[2-(1-metilpirrolidin-2-il)etil]-4-propoxibenzenesulfonamida;
- 40 • un cannabinoide;
- antagonista del receptor metabotrópico de glutamato (mGluR1) subtipo 1;
- un inhibidor de la recaptación de serotonina tal como sertralina, metabolito de la sertralina desmetilsertralina, fluoxetina, norfluoxetina (metabolito de desmetil fluoxetina), fluvoxamina, paroxetina, citalopram, metabolito del citalopram desmetilcitalopram, escitalopram, d,l-fenfluramina, femoxetina, ifoxetina, cianodotiepina, litoxetina, dapoxetina, nefazodona, cericlamina y trazodona;
- 45 • inhibidor de la recaptación de noradrenalina (norepinefrina), tal como maprotilina, lofepramina, mirtazepina, oxaprotilina, fezolamina, tomoxetina, mianserina, bupropión, metabolito de bupropión hidroxibupropión, nomifensina y viloxazina (Vivalan®), especialmente un inhibidor de la recaptación de noradrenalina selectivo tal como reboxetina, en particular (S,S)-reboxetina;
- un inhibidor dual de la recaptación de serotonina y noradrenalina, tal como venlafaxina, metabolito de la venlafaxina O-desmetilvenlafaxina, clomipramina, metabolito de la clomipramina desmetilclomipramina, duloxetina, milnaciprán e imipramina;
- 55 • un inhibidor de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) tal como ácido S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-L-homocisteína, S-[2-[(1-iminoetil)-amino]etil]-4,4-dioxo-L-cisteína, S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, (2S,5Z)-2-amino-2-metil-7-[(1-iminoetil)amino]-5-heptenoico, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil)-butil]tio]-5-cloro-3-piridinecarbonitrilo; 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-4-clorobenzonitrilo, (2S,4R)-2-amino-4-[[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]tio]-5-tiazolebutanol, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-6-(trifluorometil)-3 piridinecarbonitrilo, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-5-clorobenzonitrilo, N-[4-[2-(3-clorobenzilamino)etil]fenil]tio]feno-2-carboxamidina, o guanidinoetildisulfuro;
- 60 • un inhibidor de la acetilcolinesterasa tal como donepezilo;

- un antagonista de prostaglandina E₂ subtipo 4 (EP4) tal como *N*-[({2-[4-(2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)fenil]etil}amino)-carbonil]-4-metilbenzenesulfonamida o ácido 4-[(1S)-1-({[5-cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil}amino)etil]benzoico;
- un antagonista de leucotrieno B₄; tal como ácido 1-(3-bifenil-4-ilmetil-4-hidroxi-croman-7-il)-ciclopentanecarboxílico (CP-105696), ácido 5-[2-(2-Carboxietil)-3-[6-(4-metoxifenil)-5E-hexenil]oxifenoxi]-valérico (ONO-4057) o DPC-11870,
- un inhibidor de la 5-lipoxigenasa, tal como zileutón, 6-[(3-fluoro-5-[4-metoxi-3,4,5,6-tetrahidro-2H-piran-4-il])fenoxi-metil]-1-metil-2-quinolona (ZD-2138), o 2,3,5-trimetil-6-(3-piridilmetil),1,4-benzoquinona (CV-6504);
- un bloqueador de los canales de sodio, tal como lidocaína; o
- un antagonista 5-HT₃, tal como ondansetrón;

y las sales y solvatos farmacéuticamente aceptables correspondientes.

15. Una composición farmacéutica, que comprende la p75NTR(NBP) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un portador farmacéuticamente aceptable y/o un excipiente para su utilización en cualquiera una o más entre la prevención, la mejora, el control, la reducción de la incidencia del dolor o el retraso del desarrollo o evolución del mismo.

Figura 1. Secuencia de dominio extracelular p75NTR; dominios de unión a neurotrofina destacados en negrita.

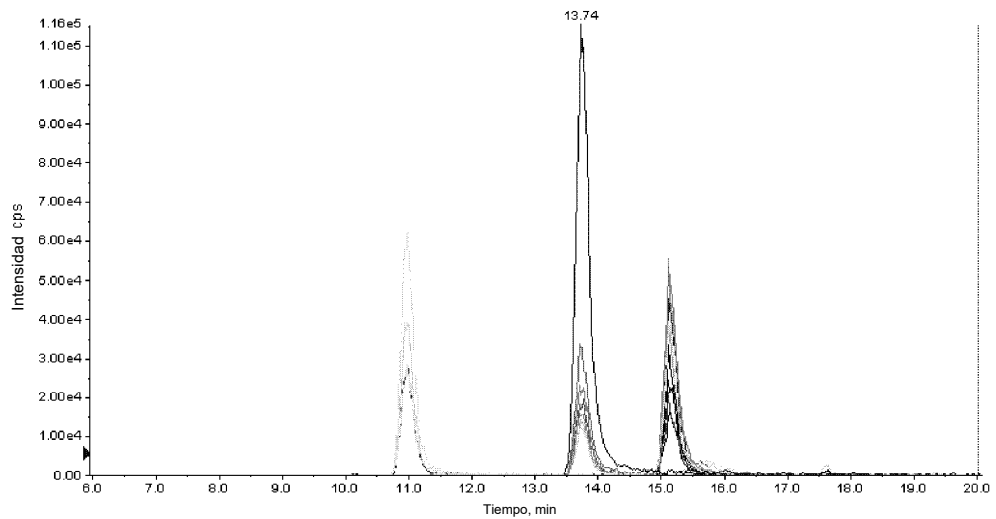
```

1  MGAGATGRAM DGPRLLLLLL LGVSLGGAKE ACPTGLYTHS GECCKACNLG
51  EGVAQPCGAN QTVCEPCLDS VTFSDVVSAT EPCKPCTECV GLQSMSAPCV
101 EADDAVCRCA YGYQDETTG RCEACRVCEA GSGLVFSCQD KQNTVCEECP
151 DGTYSDEANH VDPCLPCTVC EDTERQLREC TRWADAECEE IPGRWITRST
201 PPEGSdstap STQEPEAPPE QDLIASTVAG VTTVMGSSQ PVVTRGTTDN
251 LIPVYCSILA AVVGLVAYI AFKRWNSCKQ NKQGANSRPV NQTPPEGEK
301 LHSDSGISVD SQSLHDQQP H TQTASGQALK GDGGLYSSLP PAKREEVEKL
351 LINGSAGDTWR HLAGELGYQP EHIDSFTHEA CPVRALLASW ATQDSATLDA
401 LLAALRRIQR ADLVESLCSE STATSPV

```

Figura 2. Péptidos identificados mediante LCMS/MS de una quimera de p75NTR-Fc, digestión estándar

[a] Detección de estándar de dominio extracelular de p75NTR



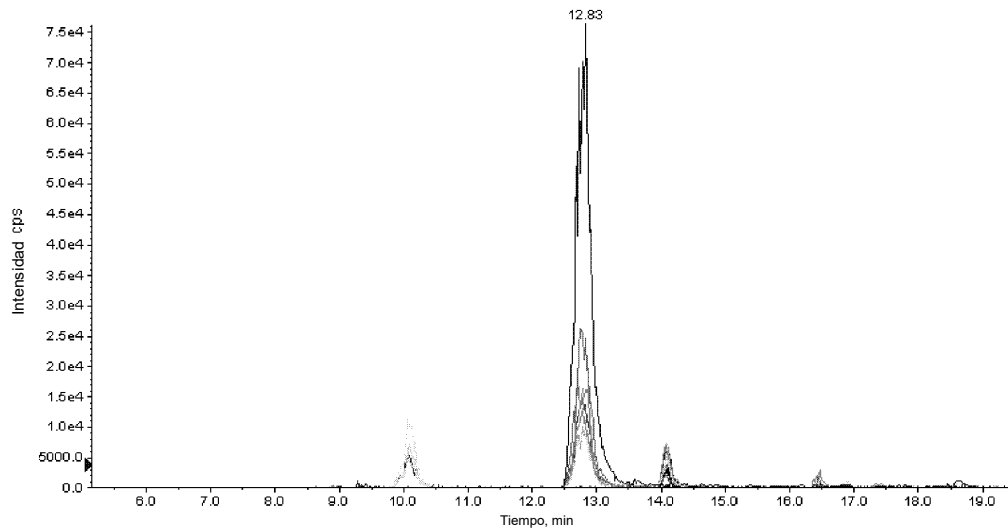
Pico a los 11.0 min = CAYGYQDETTGR

Pico a los 13.74 min = WADAECEEIPGR

Pico a los 15.2 min = VCEAGSGLVFSCQDK

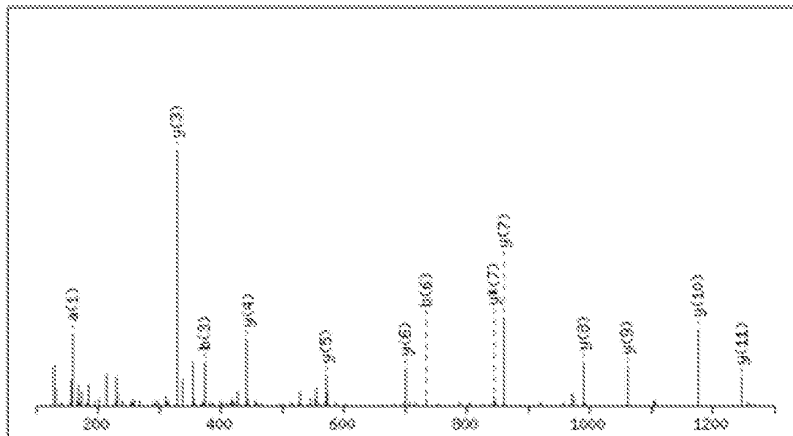
Figura 2 [b] - Péptidos identificados mediante LCMS/MS de una quimera de p75NTR-Fc, digestión estándar

[b] Detección de dominio extracelular de p75 a partir de ensayo NGF total con suero humano comercial



Pico a los 10.0 min = CAYGYYQDETTGR
 Pico a los 12.83 min = WADAECEEIPGR
 Pico a los 14.2 min = VCEAGSGLVFSCQDK

Figura 3. Confirmación de secuencia MS/MS del pico WADAECEEEIPGR mostrado en la figura 2.



Masa monoisotópica de péptido neutral **Mr(calc): 1431.61**
 Modificaciones fijas : Carbamidoximetil (C)
 Puntuación de iones 94 Previsto $4.4e-007$
 Coincidencias (No. & Ratio): 13/88 Iones fragmento utilizando los 14 picos más intensos

#	a	a ⁺⁺	b	b ⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y ⁺	y ⁺⁺⁺	#
1	159.09	80.05	187.09	94.05	W					12
2	230.13	115.57	258.12	129.57	A	1246.54	623.77	1229.51	615.26	11
3	345.16	173.08	373.15	187.08	D	1175.50	588.25	1158.47	579.74	10
4	416.19	208.60	444.19	222.60	A	1060.47	530.74	1043.45	522.23	9
5	545.24	273.12	573.23	287.12	E	989.44	495.22	972.41	486.71	8
6	705.27	353.14	733.26	367.13	C	860.39	430.70	843.37	422.19	7
7	834.31	417.66	862.30	431.66	E	700.36	350.68	683.34	342.17	6
8	963.35	482.18	991.35	496.18	E	571.32	286.16	554.29	277.65	5
9	1076.44	538.72	1104.43	552.72	I	442.38	221.64	425.25	213.13	4
10	1173.49	587.25	1201.48	601.25	P	329.19	165.10	312.17	156.59	3
11	1230.51	615.76	1258.50	629.76	G	232.14	116.57	215.11	108.06	2
12					R	175.12	88.06	158.09	79.55	1

Figura 4. p75NTR(NBP) inhibe la función NGF en la línea celular U20S que expresa TrkA y en la línea celular U20S que coexpresa TrkA y p75NTR.

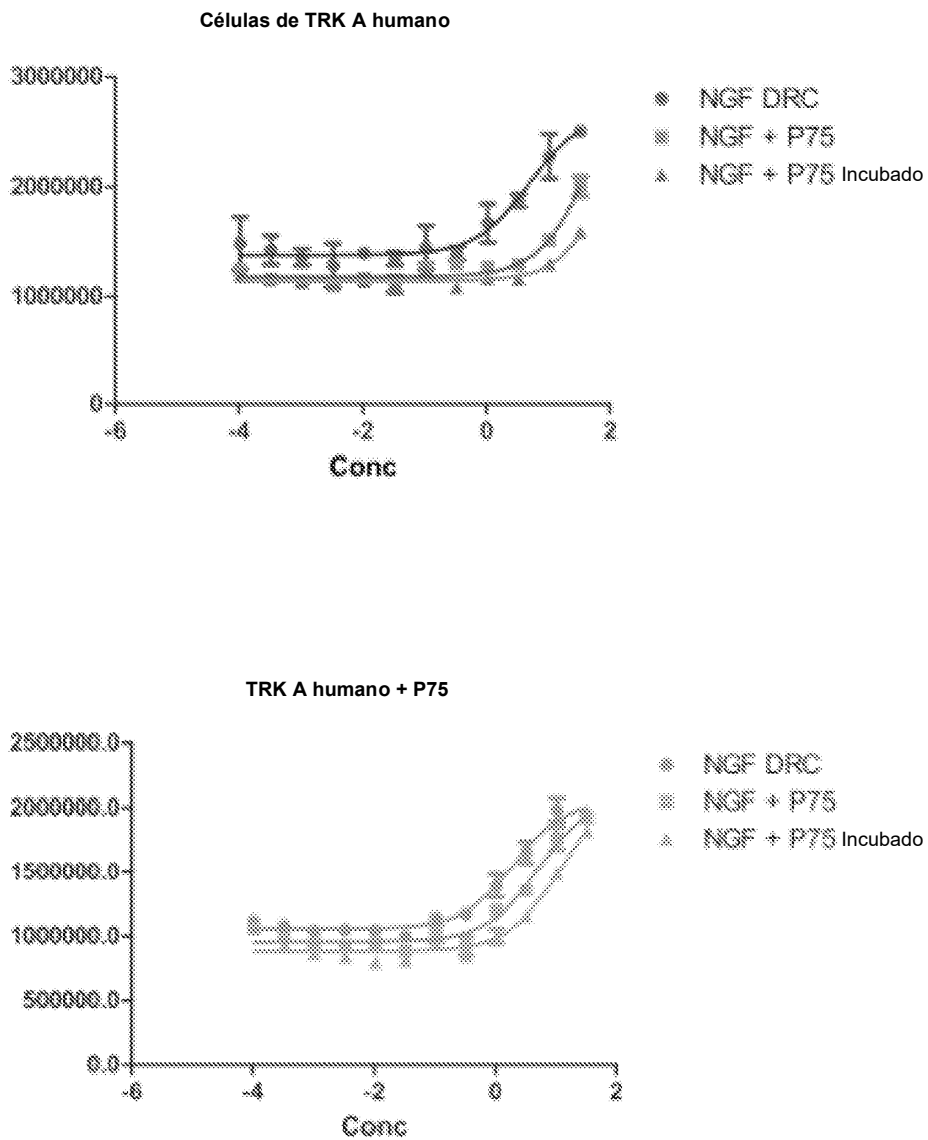


Figura 5 - p75NTR(NBP) soluble inhibe la función BDNF en la línea celular U20S que expresa TrkA y en la línea celular U20S que coexpresa TrkA y p75NTR.

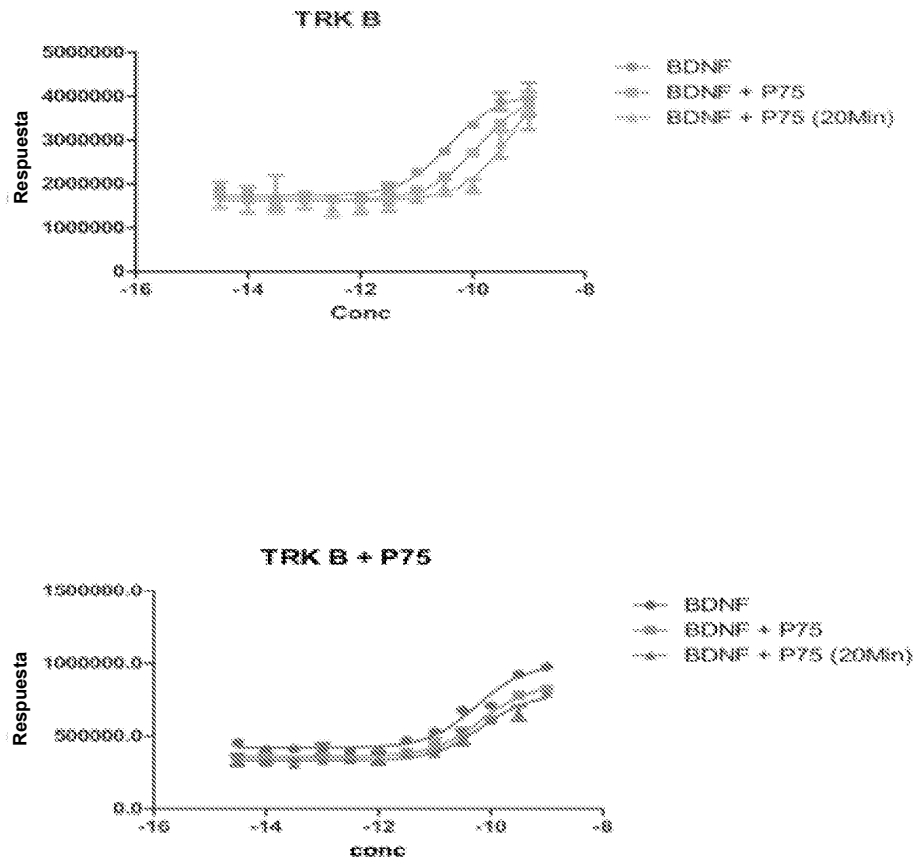


Figura 6. Datos de Biocore que demuestran la unión de p75NTR(NBP) a BDNF y la competencia entre antiBDNF y p75NTR(NBP).

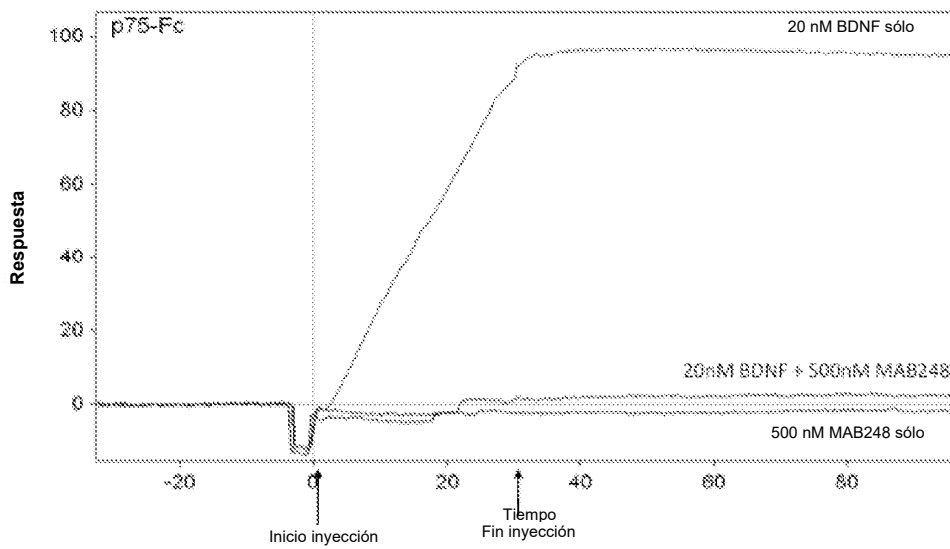


Figura 7 - Inhibición p75NTR(NBP) de actividad NGF en células PC12

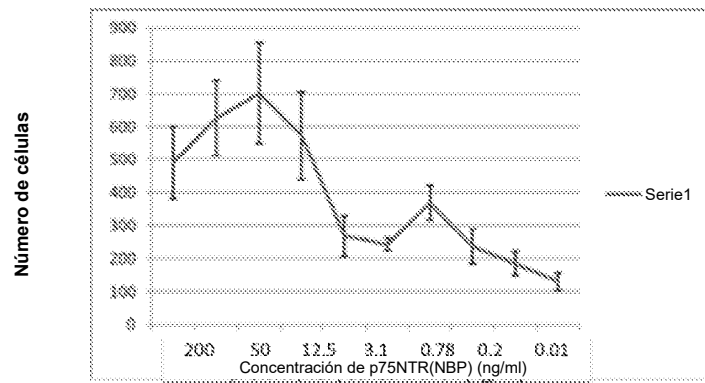
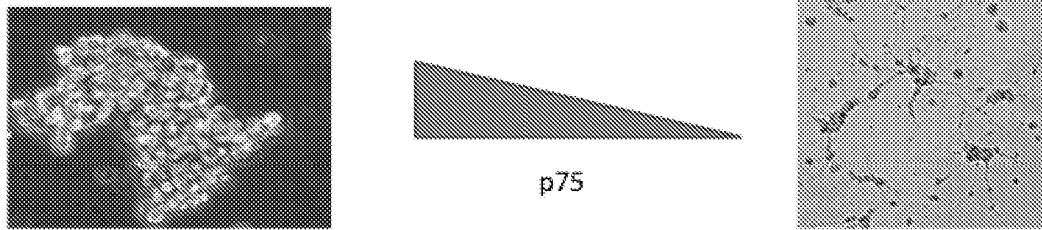
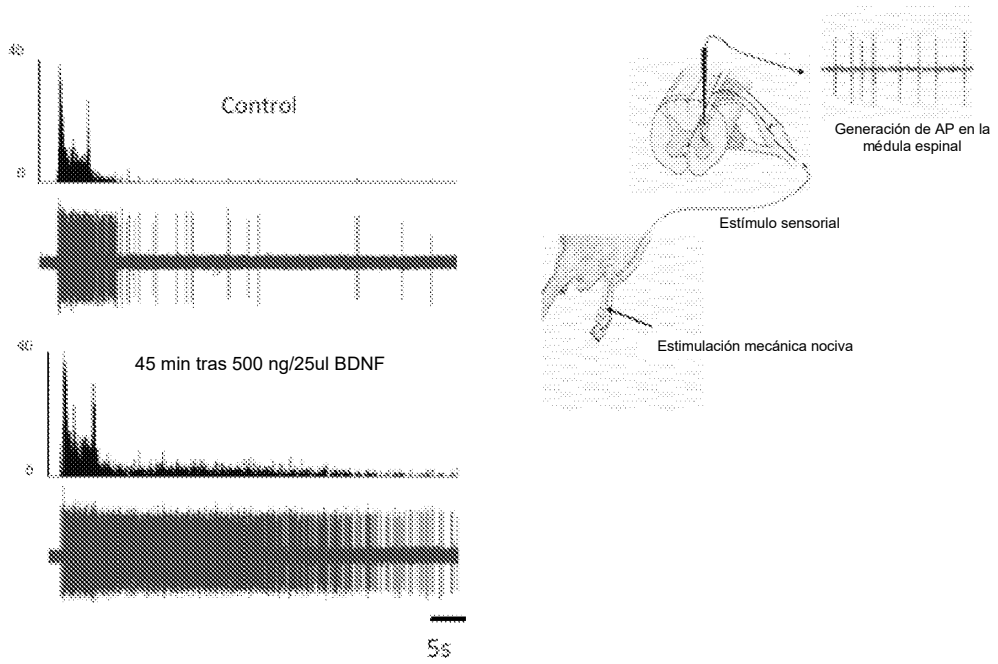


Figura 8 - p75NTR(NBP) inhibe el efecto de dolor BDNF en un modelo de excitabilidad de los nervios



Punto de referencia

Pellizco

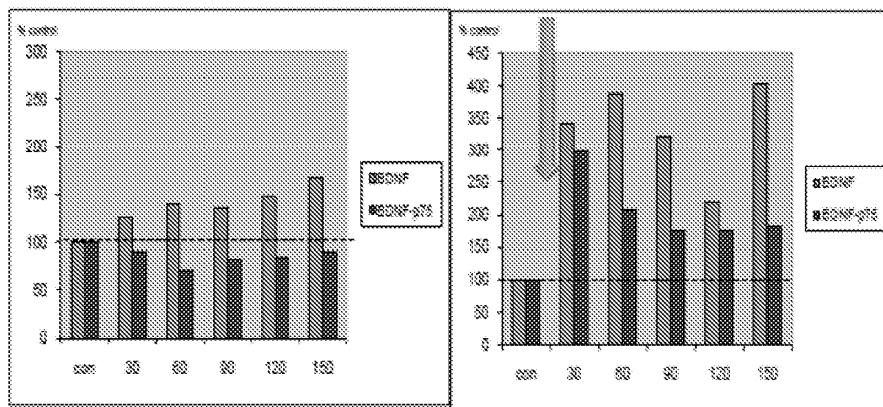


Figura 9 - La proteína de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) inhibe la hiperalgesia en un modelo UVIH

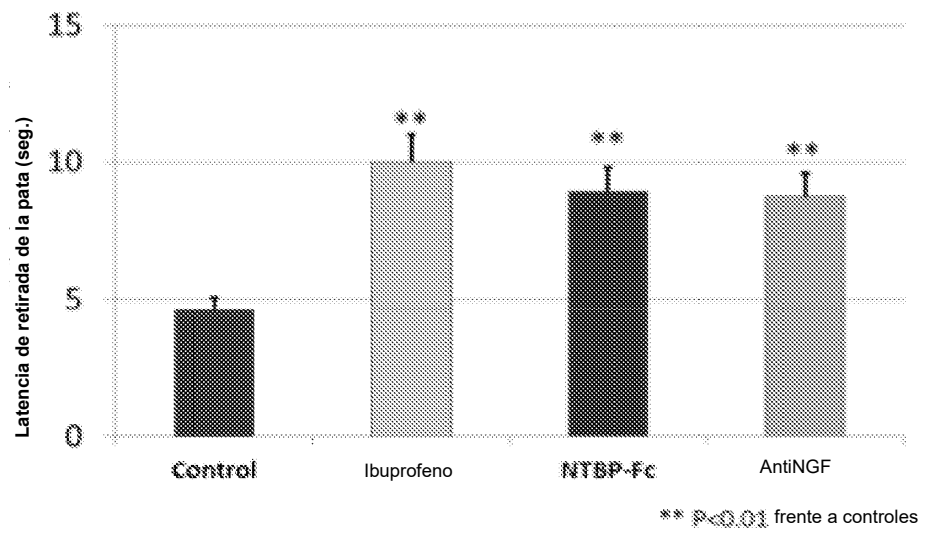


Figura 10 - SEQ ID NO. 1 Secuencia de aminoácidos completa de p75NTR humano

```

1  mgagatgram dgprllllll lgvslggake acptglyths gecckacnlg egvaqpcgan
61  qtvcepclds vtfsdvvsat epckpctecv glqmsapcv eaddavcrca ygyyqdettg
121 rceacrvicea gsglvfscqd kqntvceecp dgtysdeanh vdpclpctvc edterqlrec
181 trwadaecee ipgrwitrst ppegdstap stqepeappe qdliastvag vttvmgssq
241 pvvtrgttdn lipvycsila avvvglvayi afkrwnsckq nkqgansrpv nqtppegek
301 lhsdsgisvd sqslhdqgph tqtasgqalk gdgglysslp pakreevekl lngsagdtwr
361 hlagegyp ehidsfthea cpvrallasw atqdsatlida llaalrriqr adlveslcse
421 statspv
    
```

Figura 11 - SEQ ID NO. 2 Dominio extracelular de p75NTR humano que incluye secuencia señal

```

1  mgagatgram dgprllllll lgvslggake acptglyths gecckacnlg egvaqpcgan
61  qtvcepclds vtfsdvvsat epckpctecv glqmsapcv eaddavcrca ygyyqdettg
121 rceacrvicea gsglvfscqd kqntvceecp dgtysdeanh vdpclpctvc edterqlrec
181 trwadaecee ipgrwitrst ppegdstap stqepeappe qdliastvag vttvmgssq
241 pvvtrgttdn
    
```

Figura 12 - SEQ ID NO. 3 Dominio extracelular de p75NTR humano sin secuencia señal

```

ke acptglyths gecckacnlg egvaqpcgan qtvcepclds vtfsdvvsat epckpctecv
glqmsapcv eaddavcrca ygyyqdettg rceacrvicea gsglvfscqd kqntvceecp gtydeanh
vdpcpctvc edterqlrec trwadaecee ipgrwitrst ppegdstap stqepeappe
qdliastvag vttvmgssq pvvtrgttdn
    
```

Figura 13 - SEQ ID NO. 4 Dominio 1 de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) humana

CAYGYQDETTGR

Figura 14 - SEQ ID NO. 5 Dominio 2 de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) humana

VCEAGSGLVFSCQD KQNTVCEEC PGGTYSDEANH VDPCLPCTVCEDETER

Figura 15 - SEQ ID NO. 6 Dominio 3 de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) humana

VCEAGSGLVFSCQDK

Figura 16 - SEQ ID NO. 7 Dominio 4 de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) humana

WADAECEEIPGR

Figura 17 - SEQ ID NO. 8 Dominio 5 de unión a neurotrofina p75NTR(NBP) humana

LDSVTSDVVSATEPCKP

Figura 18 - SEQ ID NO. 9 Transferrina humana

```

1  mrlavgallv cavlgiclav pdktvrwacv seheatkcqs frdhmksvip sdgpsvacvk
61  kasyldcira iaaneadavt ldaglvday lapnnlkpvv aefygskedp qtfyyavavv
121 kkdsgfqmng lrgkkschtg lgrsagwnip igllycdlpe prkplekava nffsgscapc
181 adgtdfpqlc qlcpgccgst lnqyfgysga fkclkdgagd vafvkhstif enlankadrd
241 qyellclndt rkpvdeykdc hlaqvpshtv varsmgked liwellnqag ehfgkdske
301 fqlfssphgk dllfkdsahg flkvpprmda kmlygyeyvt airnlregtc peaptdeckp
361 vkwcalshhe rlkcdewsvn svgkiecvsa ettedciaki mngeadamsl dggfvyiagk
421 cglvpvlaen ynksdncedt peagyfavav vkksasdlw dnlkgkksch tavgrtagwn
481 ipmgllynki nhcrfdeffs egcapgskkd sslcklcmgs glnlcepnnk egyygytgaf
541 rclvekgdva fvkhtvppn tggknpdpwa knlnekdyel lcldgtrkp eeyanchlar
601 apnhavvtrk dkeacvhkil rqqqhlfgsn vtdcsgnfc1 frsetkdllf rddtvclakl
661 hdntyekyl geeykavgn lrckstssll eactfrrp
    
```

Figura 19 - SEQ ID NO. 10 Albúmina humana

```

1 mkwvtfisll flfssaysrg vfrrdahkse vahrfkdige enfkalvlia faqylqqcpf
61 edhvklvnev tefaktcvad esaencdksl htlfgdklct vatltretyge madccakqep
121 ernecflqhk ddnplnlprlv rpevdvmcta fhdneetflk kylyeiarrh pyfyapellf
181 fakrykaaft eccqaadkaa cllpkldelr degkassakq rlkcaslqkf gerafkawav
241 arlsqrfpka efaevsklvt dltkvhtecc hgdlllecadd radlakyice nqdsissklk
301 eccekpillek shciaevend empadlpsla adfveskdvc knyaeakdvf lgmflyeyar
361 rhpdyvsvll lrlaktyett lekccaaadp hecyakvfde fkplveepqn likqncelfe
421 qlgeykfqna llvrytkkvp qvstptlvev srnlgkvgsk cckhpeakrm pcaedylsvv
481 lnqlcvlhek tpsvdrvtkc cteslvnrp cfsalevdet yvpkefnaet ftfhadictl
541 sekerqikkq talvelvkhk pkatkeqlka vmddfaafve kckkaddket cfaeegkklv
601 aasqaalgl

```

Figura 20 - SEQ ID NO. 11 Fc IgG1 humana

```

1 ggpsvflfpp kpkdtlmisr tpevtcvvvd vshedpevkf nwyvdgvevh naktkpreeq
61 ydstyrvvsv ltvlhqdwln gkeykckvsn kalpapiekt iskakgqpre pqvlytlppsr
121 eemtknqvsl tclvkgyfyps diavewesng qpennykttp pvldsdgsff lyskltvdks
181 rwqqgnvfsc svmhealnhn ytqkslsisp gk

```

Figura 21 - SEQ ID NO. 12 Fc IgG2 humana

```

1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv htfpavllqss
61 glyslssvvt vtssnfgtqt ytcnvdhkps ntkvdkver kccvecppcp appvagpsvf
121 lfppkpkdtl misrtpevtc vvvvdshedp evqfnwyvdg mevhnaktkp reeqfnstfr
181 vsvltvvhq dwlngkeykc kvsnkglpap iektisktkg qprepvytl ppsreemtkn
241 qvsltclvkg fypsdiavew esngqpenny kttppmlsdg gsfflysklt vdksrwqqgn
301 vfscsvmhea lnhhytqksl slspgk

```

Figura 22 - SEQ ID NO. 13 Fc IgG3 humana

```

1 cytlllllttp swvlsqvtkl esgpvlvkpt etltltctvs gfslsnakmg vswirqppgk
61 alewlahifs ndeksystsl ksrltiskdt sksqvvlmt nmdpvdttat ycariftity
121 snyvlqyyyy mdvwgkgttv tvssastkqp svfplapcsr stsgg

```

Figura 23 - SEQ ID NO. 14 Fc IgG4 humana

```

1 apeflggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvsqed pevqfnwyvd gvevhnaktk
61 preeqfnsty rvsvltvlh qdwlngkeyk ckvsnkglps siektiskak gqprepvyt
121 lppsqeemtk nqvsltclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds dgsfflyskl
181 tvdksrwqeg nvfscsvmhe alnhhytqks lsllsgk

```

Figura 24 - SEQ ID NO. 15 Fragmento Fc humano creado para semivida de suero extendida

```

1 ggpsvflfpp kpkdtlyitr epevtcvvvd vshedpevkf nwyvdgvevh naktkpreeq
61 ynstyrvvsv ltvlhqdwln gkeykckvsn kalpapiekt iskakgqpre pqvlytlppsr
121 deltknqvsl tclvkgyfyps diavewesng qpennykttp pvldsdgsff lyskltvdks
181 rwqqgnvfsc svmhealnhn ytqkslsis

```

Figura 25 - SEQ ID NO. 16 Fragmento Fc humano creado para funciones de falta de efector

```
1 thtppcpap efeggpsvfl fppkpkdtlm isrtpevtcv vvdvshedpe vkfnwyvdgv
61 evhnaktkpr eeqynstyrv vsvltvlhqd wlngkeykck vsnkalpasi ektiskakgq
121 prepqvytlp psreemtknq vsltclvkgf ypsdiavewe sngqpennyk ttpvldsdg
181 sfflyskltv dksrwqqgnv fscsvmheal hnhytqksls lspgk
```

Figura 26 - SEQ ID NO. 17 Enlace p75NTR(NBP)-Fc

(GGGGS) n ($n = 1$ a 4)

Figura 27: SEQ ID NO. 18 Enlace p75NTR(NBP)-Fc

(EAAAK) n ($n = 2$ a 5)

Figura 28: SEQ ID NO. 19 Enlace p75NTR(NBP)-Fc

GGGGS