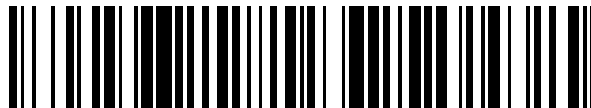


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 694**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2014 PCT/GB2014/052833**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015 WO15040398**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2014 E 14772194 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3046934**

54 Título: **Proteína de fusión**

30 Prioridad:
18.09.2013 GB 201316592

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2019

73 Titular/es:
**LEVICEPT LTD. (100.0%)
3 Burlington Gardens
London W1S 3EP, GB**

72 Inventor/es:
WESTBROOK, SIMON

74 Agente/Representante:
RIZZO, Sergio

ES 2 714 694 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 fusión.

Antecedentes de la invención

5 **[0001]** Las neurotrofinas, el factor de crecimiento neurotrófico (NGF, por sus siglas en inglés), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) actúan por medio de cuatro receptores: el receptor neurotrófico p75 de baja afinidad (p75NTR) y los receptores de tirosina quinasa de alta afinidad; TrkA, TrkB y TrkC. El receptor p75NTR de baja afinidad se une y es activado por medio de las cuatro neurotrofinas, y se ha descrito que funciona de manera independiente respecto a los otros receptores. Sin embargo, los receptores Trk se activan de manera más selectiva, es decir, NGF es el ligando selectivo para TrkA, BDNF es el ligando para TrkB y NT-3, 4/5 son los ligandos para TrkC. Asimismo, se ha descrito que cuando las proteínas p75NTR y Trk se coexpresan, estas forman complejos que alteran las señales de ambos receptores (Huang y Reichardt, 2003, *Annu Rev Biochem.* 72:609-42). De hecho, se ha insinuado que p75NTR facilita la selectividad de cada una de las neurotrofinas por su respectivo receptor Trk.

15 **[0002]** El p75NTR es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR-SF) 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) de 40 aminoácidos que se identificó primero en p75NTR (Johnson *et al.*, 1986 *Cell* 47:545-554; Radeke *et al.*, 1987 *Nature* 325:593-597). En cambio, los dominios intracelulares de todos los miembros de la familia TNFR-SF no comparten ningún motivo secuencial. Por consiguiente, los mecanismos de señalización de las proteínas TNFR-SF varían de manera significativa.

25 **[0003]** Una característica inusual de la estructura de p75NTR es la existencia de un dímero de p75NTR con enlace disulfuro, formado por medio de residuos de cisteinil en los dominios transmembranales. Este enlace disulfuro resulta necesario para que el p75NTR realice una señalización eficaz dependiente de neurotrofinas, y desempeña una función importante en la formación de un dominio intracelular y extracelular (Vilar *et al.*, 2009 *Neuron* 62:72-83). Las neurotrofinas existen fisiológicamente como dímeros asociados de manera no covalente (Bothwell y Shooter, 1977 *J Biol Chem.* 252(23):8532-6) con una vida media de distribución de aproximadamente 5 min (Tria *et al.*, 1994 *Exp Neurol.* 127(2):178-83). La activación de p75NTR dependiente de neurotrofinas conlleva la asociación de un dímero de neurotrofina con CRD 2-4 de los dos dominios extracelulares de un dímero p75NTR (He y Garcia, 2004 *Science* 304:870-875). Estudios recientes respaldan un modelo en el que la unión a neurotrofinas provoca que los dos dominios extracelulares de los dímeros p75NTR se acerquen más entre sí, lo cual deriva en que los dominios intracelulares se separen con un movimiento similar al de las pinzas para caracoles centrado en el enlace disulfuro, y posibilita una asociación de los dominios intracelulares con las proteínas adaptadoras de señales, NRIF y TRAF6 (Vilar *et al.*, 2009 *J Cell Sci* 122:3351-3357, Vilar *et al.*, 2009 *Neuron* 62:72-83). Los enlaces disulfuro de dominio intratransmembranal, tal como están presentes en p75NTR, no se han descrito anteriormente en otros miembros de la familia TNFR-SF ni en cualquier otra proteína de membrana.

40 **[0004]** p75NTR se somete a escisión proteolítica secuencial mediante actividades α -secretasa y γ -secretasa y metaloproteinasas de matriz (MMP), liberando su dominio intracelular (ICD) en el citoplasma, de manera análoga a la vía de señalización dependiente de la escisión de la proteína precursora β -amiloide y Notch (Jung *et al.*, 2003 *J Biol Chem* 278:42161-42169; Kanning *et al.*, 2003 *J Neurosci* 23:5425-5436). La liberación citoplásmica del ICD de p75NTR por esta vía estimula la señalización de la NRIF asociada (Kenchappa *et al.*, 2006 *Neuron* 50:219-232). La función del dominio extracelular de p75NTR, posteriormente a la escisión proteolítica mediante las actividades α -secretasa y γ -secretasa y las MMP, no se comprende completamente.

45 **[0005]** Se ha documentado que NGF y otras neurotrofinas (BDNF, NT-3 y NT-4/5) cumplen una función significativa en la patología, por ejemplo, en el dolor causado por la osteoartritis, pancreatitis, artritis reumatoide, psoriasis, prurito y esclerosis múltiple (Watanabe *et al.*, 2008 *J Neurosci Res.* 86(16):3566-74; Raychaudhuri *et al.*, 2011 *Arthritis Rheum.* 63(11):3243-52; Barthel *et al.*, 2009 *Arthritis Res Ther.* 11(3):R82; Truzzi *et al.*, 2011 *Cell Death Differ.* 18:948-58; McDonald *et al.*, 2011 *Curr Med Chem.* 18:234-44; Yamaoka *et al.*, 2007 *J Dermatol Sci.* 46(1):41-51). Se ha demostrado que los anticuerpos selectivos para cualquiera de las neurotrofinas, ya sea NGF o BDNF, NT-3 y NT-4/5, reducen el dolor de manera significativa. Asimismo, los anticuerpos dirigidos a los receptores de neurotrofinas p75NTR Trk A, Trk B o Trk C han demostrado ser eficaces también en modelos de dolor (Orita S *et al.*, 2010 *J Orthop Res.* 28:1614-20; Svensson P *et al.*, 2010 *Pain.* 148:473-80; Iwakura *et al.*, 2010 *J Hand Surg Am.* 35:267-73; Cirilio *et al.*, 2010 *Cell Mol Neurobiol.* 30:51-62; Pezet *et al.*, 2010 *Pain.* 90:113-25; Hayashi *et al.*, 2011 *J Pain.* 12:1059-68; Chu *et al.*, 2011 *Pain.* 152:1832-7; Ueda *et al.*, 2010 *J Pharmacol Sci.* 112:438-43; Ghilardi *et al.*, 2010 *Bone.* 48:389-98; Fukui *et al.*, 2010 *J Orthop Res.* 28:279-83). Fukui *et al.*, (2010) demostraron, en un modelo de dolor (alodinia mecánica tras un aplastamiento del nervio ciático), una eficacia considerable en criterios de valoración relacionados con el dolor tras el tratamiento con un anticuerpo anti-p75NTR. A raíz de este estudio, se llegó a la conclusión de que el tratamiento con un anticuerpo

inhibidor p75NTR redujo la expresión de CGRP y p75NTR, lo que dio lugar a una reducción significativa del dolor.

[0006] La presente invención se refiere a una proteína de fusión (NBP)-Fc de proteína de unión a neurotrofina p75NTR. Se describe la afinidad y la cinética *in vivo* de dicha molécula, así como su eficacia en el tratamiento del dolor en un modelo animal. La proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc resulta 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] De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se da a conocer una proteína de fusión (NBP)-Fc de proteína de unión a neurotrofina p75NTR, comprendiendo:

- (a) una porción p75NTR(NBP); y
- (b) una porción Fc de inmunoglobulina.

[0008] En esta, las porciones p75NTR(NBP) y Fc están conectadas por medio de un conector, comprendiendo el conector un péptido de fórmula G_x, donde x es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, y donde el conector no comprende ni consta de la secuencia GGGGS.

[0009] En una forma de realización especialmente preferida de la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc según la invención, la p75NTR(NBP) es una p75NTR(NBP) humana. En otra forma de realización especialmente preferida de la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc según la invención, la Fc es una Fc humana.

[0010] En otra forma de realización preferida adicional, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de la invención comprende o consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 3. En otra forma de realización preferida, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de la invención comprende o consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 15.

[0011] En una forma de realización preferida, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con la invención se une a cualquiera de NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 con una afinidad de unión (K_d) de entre aproximadamente 0,01 nM y aproximadamente 50 nM, medida mediante resonancia de plasmones superficiales a 20 °C.

[0012] En un segundo aspecto de la presente invención, se da a conocer la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc descrita conforme a cualquier otro aspecto de la invención para su uso en el tratamiento del dolor.

[0013] En un tercer aspecto de la presente invención, se da a conocer una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con el primer o el segundo aspecto de la invención, comprendiendo opcionalmente, además, la codificación de una secuencia señal.

[0014] En un cuarto aspecto de la presente invención, se da a conocer un vector de expresión replicable para transfectar a una célula, opcionalmente una célula de mamífero, comprendiendo el vector la molécula de ácido nucleico de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención.

[0015] Preferiblemente, el vector de expresión replicable es un vector viral.

[0016] En un quinto aspecto de la presente invención, se da a conocer una célula huésped que alberga la molécula de ácido nucleico del tercer aspecto de la invención.

[0017] En un sexto aspecto de la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con el tercer aspecto de la invención o el vector de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención se destina para su uso en el tratamiento del dolor.

[0018] El término dolor incluye, aunque sin carácter limitativo: dolor agudo; dolor crónico; dolor inflamatorio; dolor nociceptivo; dolor neuropático; hiperalgesia; alodinia; dolor central; dolor oncológico; dolor postoperatorio; dolor visceral; dolor musculoesquelético; dolor cardíaco o vascular; dolor de cabeza, incluyendo migrañas; dolor orofacial, incluyendo dolor dental; y dolor de espalda. El tratamiento del dolor incluye, aunque sin carácter limitativo, la prevención, mejora, control, reducción de la incidencia o retraso en el desarrollo o la evolución del dolor.

[0019] En un séptimo aspecto, se da a conocer la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con el primer o segundo aspecto, o el ácido nucleico o el vector de acuerdo con el tercer o cuarto aspecto, donde la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc o la molécula de ácido nucleico o el vector se utilizan de forma separada, secuencial o simultánea en una combinación combinado con un segundo compuesto farmacológicamente activo.

[0020] En un octavo aspecto, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica, comprendiendo la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con cualquier aspecto de la invención o la molécula de ácido nucleico o el vector de acuerdo con cualquier aspecto de la invención, y un portador y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0021] Preferiblemente, la composición farmacéutica se destina para su uso en uno o más de entre prevención, mejora, control, reducción de la incidencia o retraso del desarrollo o la evolución del dolor.

[0022] En un aspecto adicional de la presente invención, se da a conocer un kit que comprende:

5 (a) la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención, o la molécula de ácido nucleico o el vector de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención, o la composición farmacéutica según el octavo aspecto; y

10 (b) instrucciones para la administración de una cantidad efectiva de dicha proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc, molécula de ácido nucleico, vector o composición farmacéutica a un individuo para uno o más de entre la prevención o el tratamiento del dolor, o bien para mejorar, controlar, reducir la incidencia o retrasar el desarrollo o la evolución del dolor.

15 [0023] En otro aspecto adicional de la presente invención, se da a conocer un método para tratar y/o para prevenir el dolor en un individuo que comprende la administración a dicho individuo de una cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico de la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con cualquier aspecto de la invención, o la molécula de ácido nucleico o el vector de acuerdo con cualquier aspecto de la invención, comprendiendo además, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable, o la composición farmacéutica conforme al octavo aspecto de la invención.

Descripción de las figuras

[0024]

20 **Figura 1.** Secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con la presente invención (SEQ ID N.º 1). Los sitios de escisión de la alfa-secretasa y gamma-secretasa se muestran en negrita. La porción Fc de IgG1 se muestra en cursiva.

Figura 2. Producto de traducción (SEQ ID N.º 2), desde el codón de inicio hasta el de terminación, de la secuencia de ácido nucleico expuesta en la figura 4 (SEQ ID N.º 4).

25 **Figura 3.** Secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc preferida de acuerdo con la presente invención (SEQ ID N.º 3). La porción Fc de IgG1 se muestra en cursiva. La secuencia conectora entre las porciones p75NTR(NBP) y Fc aparece subrayada.

Figura 4. Secuencia de ácido nucleico del producto génico completo desde el sitio de clonación 5' hasta el sitio de clonación 3' (SEQ ID N.º 4).

30 **Figura 5.** Variantes de la proteína de fusión p75-NTR(NBP)-Fc: 1: p75_NTR - La secuencia p75-NTR (SEQ ID N.º 6); 2: La proteína de fusión p75-NTR-Fc disponible en el mercado (SEQ ID N.º 7); 3: p75_Fc - La proteína de fusión p75-NTR-Fc disponible en el mercado con la secuencia Fc modificada en función de la de la región constante de IgG1za de Lonza (SEQ ID N.º 8); 4: p75_Fc_C222S - La proteína de fusión p75-NTR-Fc disponible en el mercado con la secuencia Fc modificada en función de la de la región constante de IgG1za de Lonza y una mutación adicional de cisteína a serina en la posición 222 (SEQ ID N.º 9); 5: p75_Fc_G4x1 - Variante 1, una proteína de fusión p75-NTR-Fc propuesta con un conector de glicina de 4 residuos (SEQ ID N.º 10); 6: p75_Fc_G4Sx1 - variante 2, una proteína de fusión p75-NTR-Fc propuesta con un único conector de tetraglicina y serina (SEQ ID N.º 11); 7: p75_Fc_G4Sx2 - variante 3, una proteína de fusión p75-NTR-Fc propuesta con dos conectores de tetraglicina y serina (SEQ ID N.º 12); 8: Región constante de IgG1za de Lonza (SEQ ID N.º 13).

40 En este alineamiento, se utiliza un esquema de formato para destacar las regiones de similitud entre los receptores putativos, la proteína de fusión Fc y la región constante Fc: el estilo encuadrado se utiliza para indicar regiones de secuencia idéntica entre las proteínas variantes y la p75-NTR; el subrayado simple se emplea para indicar regiones de secuencia idéntica entre todas las proteínas de fusión Fc y la Fc de IgG1za de Lonza; la cursiva se utiliza para indicar las regiones de enlace en la unión de p75-NTR y la región constante Fc; el subrayado doble y la negrita se emplean para indicar la posición de secuencia no idéntica más allá de la región de enlace, en la posición equivalente a 222 en la proteína de fusión p75-NTR Fc parental.

Figura 6: La p75NTR-Fc reduce significativamente el dolor en un modelo de roedor con OA inducida por MIA. *P <0,1 y **P <0,05

50 **Figura 7:** Secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc preferida de acuerdo con la presente invención (SEQ ID N.º 15). La porción Fc de IgG1 se muestra en cursiva. La secuencia conectora entre las porciones p75NTR(NBP) y Fc se muestra subrayada.

Descripción detallada de la invención

55 [0025] De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se da a conocer una proteína de fusión (NBP)-Fc de proteína de unión a neurotrofina p75NTR, comprendiendo:

(a) una porción p75NTR(NBP); y

(b) una porción Fc de inmunoglobulina.

[0026] En esta, las porciones p75NTR(NBP) y Fc están conectadas por medio de un conector, comprendiendo el conector un péptido de fórmula G_x, donde x es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, y donde el conector no comprende ni consta de la secuencia GGGGS.

[0027] En una forma de realización especialmente preferida de la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc según la invención, la p75NTR(NBP) es una p75NTR(NBP) humana. En otra forma de realización especialmente preferida de la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc según la invención, la Fc es una Fc humana.

[0028] En otra forma de realización preferida adicional, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc según la invención comprende o consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 3. En otra forma de realización preferida, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de la invención comprende o consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 15.

[0029] Preferiblemente, la proteína de unión a neurotrofina p75NTR, p75NTR(NBP), está pegilada; más preferiblemente, está glicosilada.

[0030] La proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de la presente invención se une preferiblemente a cualquiera o cualesquiera de NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 con una afinidad de unión (K_d) de entre aproximadamente 0,01 nM y aproximadamente 50 nM. En algunas formas de realización preferidas, la afinidad de unión (K_d) se encuentra entre aproximadamente 0,01 nM y cualquier cantidad de aproximadamente 0,1 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM, 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 medida en un ensayo de unión *in vitro* para NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 tal como se describe en el presente documento, preferiblemente medida mediante resonancia de plasmones superficiales a 20 °C. En algunas formas de realización preferidas adicionales, la afinidad de unión (K_d) es equivalente o menor que cualquier cantidad de entre 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 medida en un ensayo de unión *in vitro* para la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc con las neurotrofinas tal como se describe en el presente documento, preferiblemente medida mediante resonancia de plasmones superficiales a 20 °C. En una forma de realización adicional más preferida, la afinidad de unión (K_d) es de aproximadamente 0,3 nM o de aproximadamente 1 nM, medida en un ensayo de unión *in vitro* para la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc con las neurotrofinas tal como se describe en el presente documento, preferiblemente medida mediante resonancia de plasmones superficiales a 20 °C.

[0031] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de la invención se destina para su uso en el tratamiento del dolor. Sin querer limitarse a ninguna teoría en particular, los inventores creen que la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc logra ser eficaz en el tratamiento del dolor incidiendo en la actividad funcional de las neurotrofinas anteriormente mencionadas (definida como la modulación o la regulación al alza o a la baja 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.

[0032] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc incide en la actividad funcional de BDNF evaluada mediante el ensayo funcional de cualquiera de entre el crecimiento y la diferenciación de las neuronas y las sinapsis, la supervivencia y la diferenciación en cultivo celular de neuronas, la señalización de Trk, la estimulación del crecimiento axonal *in vitro* o *in vivo*.

[0033] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc incide en la actividad funcional de NGF evaluada midiendo la unión de NGF a TrkA y la activación de TrkA, como se muestra en los ensayos clásicos de supervivencia neuronal (tal como se expone en Cowan *et al.*, Annu. Rev. Neurosci. 2001;24:551-600).

[0034] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc incide en la actividad funcional de NT3 evaluada midiendo la actividad de unión de NT3 al receptor Trk endógeno y la activación del receptor Trk endógeno, como se demuestra en la fosforilación del receptor Trk, en ensayos indicadores de fosforilación de proteína quinasa activada por mitógenos o ensayos de supervivencia celular y de extensión neurítica.

[0035] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc incide en la actividad funcional de NT4/5 evaluada midiendo 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, de manera alternativa, *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.

[0036] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc se une a los residuos de contacto de una o más de las neurotrofinas NGF, NT3, BDNF y NT4/5, tal como se muestra en He y Garcia (2001) Science, 301, páginas 870 - 805.

[0037] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc es soluble, preferiblemente soluble en solución acuosa, preferiblemente soluble en un fluido biológico, como suero, plasma o sangre.

[0038] Tal como se utiliza en el presente documento, se entiende por «Fc», «Fc de inmunoglobulina» o «Fc de Ig» a la porción carboxiterminal de una región constante de cadena de inmunoglobulina, preferiblemente una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina o una parte de la misma. Preferiblemente, la Fc de inmunoglobulina comprende 1) un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3, opcionalmente con una región bisagra de inmunoglobulina, 2) un dominio CH1 y un dominio CH2, opcionalmente con una región bisagra de inmunoglobulina, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, opcionalmente con una región bisagra de inmunoglobulina, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3, opcionalmente con una región bisagra de inmunoglobulina, o bien 5) una combinación de dos o más dominios seleccionados, aunque sin carácter limitativo, de entre CH1, CH2 y CH3, opcionalmente combinados con una región bisagra de inmunoglobulina. Preferiblemente, la Fc de inmunoglobulina comprende al menos una región bisagra de inmunoglobulina, un dominio CH2 y un dominio CH3, y, opcionalmente, un dominio CH1. Preferiblemente, la Fc de inmunoglobulina comprende o consta de una Fc o una porción de una Fc de una inmunoglobulina de isotipo que incluye, aunque sin carácter limitativo, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, más preferiblemente, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgA, más preferiblemente IgG1, IgG2 o IgG4, más preferiblemente IgG1. Opcionalmente, la Fc de inmunoglobulina 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.

[0039] Más preferiblemente, la Fc de inmunoglobulina comprende o consta de cualquiera de: (a) un dominio CH2 o porción del mismo y un dominio CH3 o porción del mismo, (b) un dominio CH2 o porción del mismo, o (c) un dominio CH3 o porción del mismo, donde la Fc de inmunoglobulina o porción de la misma es del isotipo que incluye, aunque sin carácter limitativo, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, más preferiblemente, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgA, más preferiblemente IgG, IgG2 o IgG4, más preferiblemente IgG1.

[0040] Preferiblemente, la Fc de inmunoglobulina comprende o consta de la región carboxiterminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y puede comprender los dominios CH2 y/o CH3, o partes de los mismos, de los isotipos de anticuerpos IgG, IgA o IgD, o bien los dominios CH2 y/o CH3 y/o CH4, o partes de los mismos de IgM o IgE. Preferiblemente, la Fc de inmunoglobulina comprende o consta de un fragmento de la Fc, que comprende principalmente CH3 y una pequeña porción de CH2, tal como puede derivar de la digestión de pepsina de la inmunoglobulina. Preferiblemente, la Fc de inmunoglobulina comprende o consta de la región Fc completa, que comprende CH2 y CH3, conectada adicionalmente a la región bisagra, que es un segmento corto de cadena pesada que conecta las regiones CH1 y CH2 en la inmunoglobulina intacta, y que se puede producir en la digestión de papaína de la inmunoglobulina. Preferiblemente, la región bisagra de inmunoglobulina comprende o consta de una región bisagra o parte de una región bisagra derivada de una IgG, preferiblemente IgG humana, más preferiblemente seleccionada, aunque sin carácter limitativo, de entre IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, más preferiblemente IgG1, o bien, de manera alternativa, es una especie o variante alélica de las formas de realización de región bisagra anteriores. La región bisagra o una parte de una región bisagra de inmunoglobulina puede situarse en el extremo C-terminal o N-terminal de la región Fc, preferiblemente en el extremo N-terminal.

[0041] De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, la Fc de inmunoglobulina comprende o consta, preferiblemente, de una Fc o una porción de una Fc de una inmunoglobulina, que comprende una o 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 en referencia a la secuencia de IgG1 natural, donde la región CH2 está en la región constante de IgG1 de la cadena pesada humana: [Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624]. Preferiblemente, la Fc de inmunoglobulina está glicosilada y altamente cargada de pH fisiológico, de modo que ayuda a solubilizar la p75NTR(NBP). La región Fc facilita también la detección de p75NTR(NBP) mediante ELISA anti-Fc, por ejemplo, con fines de diagnóstico. La p75NTR(NBP) de la invención se sintetiza preferiblemente en una célula que glicosila la Fc de Ig, preferiblemente en sitios de glicosilación normales.

[0042] Preferiblemente, la Fc de inmunoglobulina comprende o consta de una región Fc de inmunoglobulina humana.

[0043] De acuerdo con la presente invención, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc muestra, preferiblemente, propiedades biológicas ventajosas de solubilidad mejorada de p75NTR(NBP) y/o de estabilidad de p75NTR(NBP) y/o p75NTR(NBP) con una vida media sérica mejorada. Se desea una solubilidad mejorada 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 dosificación precisa de la p75NTR(NBP). La solubilidad mejorada resulta ventajosa para superar el problema de los agregados, que no son deseables, ya que provocan dolor en la administración *in vivo* y derivan en una potencial inflamación. La mejora de la vida media sérica presenta la ventaja de facilitar niveles reducidos o una frecuencia reducida de la dosis requerida durante su utilización para el tratamiento con el fin de lograr el efecto terapéutico equivalente o mantenido de la p75NTR(NBP) administrada. Una vida media prolongada y una mayor estabilidad en sangre o suero conlleva la ventaja de permitir una pauta posológica con dosis menos frecuentes y/o niveles de dosis menores, reduciendo de este modo la posible toxicidad o los posibles efectos secundarios *in vivo*. En este caso, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc es más potente en cuanto a su efecto terapéutico y/o más estable en la circulación. Las dosis

resultantes menores o menos frecuentes resultan ventajosas para minimizar cualquier posible efecto tóxico o efecto secundario potencialmente asociado a la administración de p75NTR(NBP). El peso molecular de la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc también aumenta a lo largo de la p75NTR(NBP) simple, y este hecho conlleva la ventaja de que la molécula quedará bien retenida en la circulación sanguínea cuando se administre de forma intravenosa, lo cual reduce el riesgo de penetración en sitios no deseados, por ejemplo, el sistema nervioso central, lo que provoca que la molécula sea adecuada para la retención o concentración en los tejidos diana. Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc muestra una solubilidad mejorada de p75NTR(NBP) y/o una mejora de la estabilidad de p75NTR(NBP) y/o una mejora en la vida media sérica en comparación con la p75NTR(NBP) simple. Preferiblemente, la solubilidad mejorada se refiere a la solubilidad en una solución acuosa, como agua, preferiblemente con excipientes tales como tampones y/o sales, preferiblemente con un pH fisiológico, preferiblemente comprendido entre pH 5 y pH 8, preferiblemente aproximadamente pH 7, o a la solubilidad en un fluido biológico, tal como suero o sangre. Preferiblemente, la estabilidad mejorada se refiere a la estabilidad de actividad o integridad estructural de la proteína p75NTR(NBP) a causa de los efectos de desnaturalización, oxidación, fragmentación o agregación durante un período de tiempo, durante un período de almacenamiento o tras someterse a congelación y descongelación. La estabilidad estructural se puede calcular empleando medidas convencionales de desnaturalización, oxidación, agregación o agregación, y la estabilidad de actividad se puede medir mediante los ensayos de unión o funcionales expuestos en el presente documento. Se conocen métodos para medir la vida media sérica de la proteína.

[0044] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc se puede expresar a niveles elevados a partir de varias células huésped de mamífero para proporcionar una única especie, y se puede purificar de manera eficaz mediante cromatografía de afinidad, por ejemplo, uniéndose a la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc se puede dimerizar y, preferiblemente, el dímero presenta un aumento de la afinidad a las neurotrofinas NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 en comparación con la p75NTR(NBP) simple. Una unión más firme conlleva la ventaja de una mayor potencia y una mayor eficacia terapéutica calculada mediante los efectos de la p75NTR(NBP), por ejemplo, determinada mediante los ensayos funcionales de neurotrofina expuestos en el presente documento. Una potencia más elevada conlleva la ventaja de que la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc se pueda utilizar en cantidades de dosis menores para lograr la misma eficacia terapéutica, de modo que se reduzca la posible toxicidad o los posibles efectos secundarios *in vivo*.

[0045] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de la invención posee una vida media *in vivo* superior o equivalente a aproximadamente cualquiera de 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, 162, 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 +/-1 hora; además, preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de la invención presenta una vida media *in vivo* de aproximadamente 24 horas o más.

[0046] Más preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de la invención posee una vida media *in vitro* superior o equivalente a aproximadamente cualquiera de entre 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, 162, 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 +/-1 día, y además, preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de la invención posee una vida media *in vitro* de aproximadamente 6 días o más. Preferiblemente, la estabilidad se mide aproximadamente en el pH fisiológico, en una solución acuosa tamponada, preferiblemente a 20 °C o 37 °C.

[0047] De acuerdo con las formas de realización preferidas anteriormente mencionadas, preferiblemente, la vida media *in vivo* es la vida media en ratas o la vida media en humanos, más preferiblemente en humanos. Preferiblemente, la vida media se determina a partir de mediciones séricas de los niveles de proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de la invención tras la administración *in vivo*, por ejemplo, mediante inyección intravenosa o subcutánea.

[0048] Las porciones p75NTR(NBP) y Fc de inmunoglobulina de la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc están conectadas por medio de un conector. Preferiblemente, el conector comprende o consta de un aminoácido o una pluralidad de aminoácidos o comprende o consta de una secuencia polipeptídica de aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 aminoácidos, preferiblemente de cualquier cantidad entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 aminoácidos, más preferiblemente de 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.

[0049] Preferiblemente, el conector comprende o consta de una secuencia polipeptídica de aminoácidos que carece de cualquier estructura secundaria estable, tal como una hélice alfa, cadena beta, hélice 3_{10} y hélice π , hélice de poliprolina, lámina alfa. Preferiblemente, la región de enlace comprende o consta de una secuencia

polipeptídica de aminoácidos que define un polipéptido flexible, dinámico o no estructurado, tal como, por ejemplo, un bucle flexible, enrollamiento al azar o giro flexible. Dichos polipéptidos no estructurados se suelen encontrar conectando regiones de estructura secundaria en moléculas proteicas grandes.

5 **[0050]** Preferiblemente, el conector es una secuencia polipeptídica de aminoácidos que comprende una cantidad mayor o equivalente a aproximadamente un 50 % de glicina y/o alanina y/o serina en p75NTR(NBP), más preferiblemente mayor o equivalente a aproximadamente 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 consta de 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
10 comprende o consta de conectores flexibles.

[0051] Sin pretender limitarse a ninguna teoría en particular, los inventores creen que los conectores flexibles solucionan o previenen el impedimento estérico que podría interferir en la capacidad de unión a neurotrofinas anteriormente mencionada o en la actividad biológica de la fusión p75NTR(NBP)-Fc en comparación con la p75NTR(NBP) simple. Por lo tanto, la región de enlace posibilita, preferiblemente, la flexibilidad entre la porción p75NTR(NBP) y la porción Fc de inmunoglobulina y permite la conservación o la mejora de la actividad biológica mencionada anteriormente de la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc en comparación con la p75NTR(NBP) simple libre o nativa determinada mediante la unión a neurotrofinas empleando ensayos de unión tales como los descritos en el presente documento.
15

[0052] Más preferiblemente, el conector es inmunológicamente inerte, de tal modo que no provoca lisis mediada por complemento, no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA) y no activa la microglía ni las células T. Preferiblemente, la región de enlace se reduce en una o más de estas actividades.
20

[0053] Más preferiblemente, el conector comprende o consta de un polipéptido que se sabe o se predice, a partir del análisis estructural o la predicción estructural, que es un polipéptido flexible, dinámico o no estructurado, o que carece de una estructura secundaria estable.
25

[0054] El conector comprende un péptido de fórmula G_x, donde x es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, donde el conector no comprende ni consta de la secuencia GGGGS.

[0055] La proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de la invención también puede comprender un sitio de escisión proteolítica, opcionalmente interpuesto entre la porción p75NTR(NBP) y la porción Fc de la inmunoglobulina. El sitio de escisión proteolítica puede estar situado en el conector o en la unión del conector con la porción p75NTR(NBP) y/o con la porción Fc de la inmunoglobulina. La p75NTR(NBP) puede escindirse, opcionalmente, de la porción Fc de la inmunoglobulina antes de la formulación y/o de la administración con fines terapéuticos.
30

[0056] De manera alternativa, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de la invención se puede modificar para eliminar los sitios de escisión proteolítica. En una forma de realización preferida, se pueden eliminar los sitios de escisión de alfa-secretasa y gamma-secretasa. En una forma de realización especialmente preferida, se elimina la secuencia GSSQPVVTRGTTDNDIEGRMD (SEQ ID N.º 5).
35

[0057] En formas de realización adicionales preferidas, se pueden cambiar ciertos aminoácidos en la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc con el fin de mejorar propiedades, tales como el rendimiento o la solubilidad. Una forma de realización especialmente preferida es el cambio del residuo de cisteína en la posición 222 a un residuo de serina, que se descubrió que reducía la agregación de la proteína, ya que se expresa a partir de células CHO durante la elaboración de la proteína.
40

[0058] Preferiblemente, el conector y/o la porción Fc de la inmunoglobulina no perjudica(n) ni afecta(n) de manera significativa a la porción p75NTR(NBP) en cuanto a:

45 (a) su efecto en la actividad funcional de las neurotrofinas (definido como modulación o regulación al alza o a la baja de la actividad funcional de las neurotrofinas) NGF, BDNF, NT3 o NT4/5,

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

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

50 **[0059]** Según otro aspecto de la invención, se da a conocer una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con el primer o segundo aspecto. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico se utiliza en el tratamiento del dolor.

[0060] De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, la molécula de ácido nucleico puede comprender, además, una región que codifica una secuencia señal, preferiblemente una secuencia señal de p75NTR, por ejemplo, una secuencia de ADN o de ARN.
55

[0061] De acuerdo con otro aspecto de la invención, 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.

5 **[0062]** Además, de acuerdo con los aspectos anteriores de la invención, se da a conocer un método de expresión de la molécula de ácido nucleico o del vector de la invención para producir o secretar la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc. Preferiblemente, el método comprende la introducción de la molécula de ácido nucleico o del vector en una célula y la expresión del ácido nucleico que se encuentra en esta para producir o secretar la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico o el vector se introduce en la célula *in vitro*, y de manera alternativa, *in vivo*. Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc se expresa *in vitro* y además, opcionalmente, se aísla y se purifica; de manera alternativa, preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc expresada se expresa *in vivo*, y preferiblemente, la expresión *in vivo* constituye terapia génica. Preferiblemente, el vector es un vector de expresión replicable, opcionalmente, para transfectar una célula de mamífero y, preferiblemente, el vector es un vector viral.

10 **[0063]** De acuerdo con otro aspecto de la invención, se da a conocer una célula huésped que alberga la molécula de ácido nucleico o el vector del tercer o del cuarto aspecto; preferiblemente, la célula es una célula de mamífero.

[0064] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se da a conocer la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc para su uso en el tratamiento del dolor, o bien un ácido nucleico o vector para su uso en el tratamiento del dolor. El dolor puede incluir, aunque sin carácter limitativo:

- 20 (a) dolor agudo y/o dolor espontáneo,
 (b) dolor crónico y/o dolor continuo,
 (c) dolor inflamatorio, incluyendo cualquiera de entre dolor artrítico, dolor provocado por osteoartritis o por artritis reumatoide, como resultado de enfermedades inflamatorias intestinales, psoriasis y eccema,
 (d) dolor nociceptivo,
 25 (e) dolor neuropático, incluyendo neuropatía diabética dolorosa o dolor asociado a la neuralgia postherpética,
 (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 la epilepsia,
 30 (i) dolor oncológico
 (j) dolor postoperatorio,
 (k) dolor visceral, incluido el dolor visceral digestivo y el dolor visceral no digestivo, dolor causado por trastornos gastrointestinales (GI), dolor provocado por trastornos funcionales intestinales (TFI), dolor provocado por enfermedades inflamatorias intestinales (EII), dolor provocado por la dismenorrea, dolor pélvico, cistitis, cistitis intersticial o pancreatitis,
 35 (l) dolor musculoesquelético, mialgia, fibromialgia, espondilitis, artropatías seronegativas (no reumatoides), reumatismo no articular, distrofinopatía, glucogenólisis, polimiositis, piomiositis,
 (m) dolor cardíaco o vascular, dolor provocado por angina, infarto de miocardio, estenosis mitral, pericarditis, fenómeno de Raynaud, escleredema, escleredema o isquemia del músculo esquelético,
 40 (n) dolor de cabeza, incluyendo la migraña, migraña con aura, migraña sin aura, cefalea histamínica, cefalea tensional.
 (o) dolor orofacial, incluyendo el dolor dental, dolor miofascial temporomandibular o tinnitus, o bien
 (p) dolor de espalda, bursitis, dolor menstrual, migraña, dolor referido, neuralgia del trigémino, hipersensibilización, dolor provocado por trauma espinal y/o degeneración o apoplejía.

45 **[0065]** El tratamiento del dolor incluye, aunque sin carácter limitativo, la prevención, mejora, control, reducción de la incidencia o retraso en el desarrollo o en la evolución del dolor.

50 **[0066]** De acuerdo con otro aspecto de la invención, se da a conocer la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc según el primer o segundo aspecto o las formas de realización preferidas de estos, o la molécula de ácido nucleico o el vector según el tercer y cuarto aspectos, donde la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc o la molécula de ácido nucleico o el vector se utilizan de forma separada, secuencial o simultánea en una combinación combinados con un segundo compuesto farmacológicamente activo. Preferiblemente, el segundo compuesto farmacológicamente activo de la combinación puede incluir, aunque sin carácter limitativo;

- un analgésico opioide, por ejemplo, morfina, heroína, hidromorfona, oximorfona, levorfanol, levalorfanol, metadona, meperidina, fentanilo, cocaína, codeína, dihidrocodeína, oxycodona, hidrocodona, propoxifeno, nalmeveno, nalorfina, naloxona, naltrexona, buprenorfina, butorfanol, nalbufina o pentazocina;
- 5 • un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE), por ejemplo, aspirina, diclofenaco, diflusal, etodolaco, fenbufeno, fenoprofeno, flufenisal, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, nimesulida, nitroflurbiprofeno, olsalazina, oxaprozina, fenilbutazona, piroxicam, sulfasalazina, sulindaco, tolmetina o zomepirac;
- 10 • un sedante barbitúrico, por ejemplo, amobarbital, aprobarbital, butabarbital, butalbital, mefobarbital, metarbital, metohexital, pentobarbital, fenobarbital, secobarbital, talbutal, tiamilal o tiopental;
- una benzodiazepina que presente una acción sedante, por ejemplo, clordiazepóxido, clorazepato, diazepam, flurazepam, lorazepam, oxazepam, temazepam o triazolam;
- un antagonista H₁ que presente una acción sedante, por ejemplo, difenhidramina, pirlamina, prometazina, clorfeniramina o clorciclizina;
- 15 • un sedante, tal como glutetimida, meprobamato, metacualona o dicloralfenazona;
- un relajante del músculo esquelético, por ejemplo, baclofeno, carisoprodol, clorzoxazona, ciclobenzaprina, metocarbamol u orfenadrina;
- un antagonista del receptor NMDA, por ejemplo, dextrometorfano ((+)-3-hidroxi-N-metilmorfinano) o su metabolito dextrofanol ((+)-3-hidroxi-N-metilmorfinano), ketamina, memantina, pirroloquinolina quinona, ácido cis-4-(fosfonometil)-2-piperidina carboxílico, budipina, EN-3231 (MorphiDex®, una formulación de combinación de morfina y dextrometorfano), topiramato, neramexano o perzinfotel, incluyendo un antagonista de NR2B, por ejemplo, ifenprodil, traxoprodil o (-)-(R)-6-{2-[4-(3-fluorofenil)-4-hidroxi-1-piperidinil]-1-hidroxietil-3,4-dihidro-2(1H)-quinolinona};
- 20 • 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;
- 25 • un antidepresivo tricíclico, por ejemplo, desipramina, imipramina, amitriptilina o nortriptilina;
- un anticonvulsivo, por ejemplo, carbamazepina, lamotrigina, topiramato o valproato;
- un antagonista de taquicinina (NK), en concreto, un antagonista de NK-3, NK-2 o NK-1, por ejemplo, (αR,9R)-7-[3,5-bis(trifluorometil)benzil]-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]-metilamino]-2-fenilpiperidina (2S,3S)];
- 30 • un antagonista muscarínico, por ejemplo, oxibutinina, tolterodina, propiverina, cloruro de trospio, darifenacina, solifenacina, temiverina e ipratropio;
- un inhibidor selectivo de COX-2, por ejemplo, celecoxib, rofecoxib, parecoxib, valdecoxib, deracoxib, etoricoxib o lumiracoxib;
- un analgésico de alquitrán de hulla, en concreto paracetamol;
- 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, aplindore, eplivanserina, osanetant, rimonabant, meclinetant, Miraxion® o sarizotán;
- 40 • un agonista del receptor vaniloide (p. ej., resiniferatoxina) o un antagonista del receptor vaniloide (p. ej., capsacepina);
- 45 • un beta adrenérgico, tal como propranolol;
- un anestésico local, tal como mexiletina;
- un corticosteroide, tal como dexametasona;
- 50 • un agonista o antagonista del receptor 5-HT, especialmente un agonista de 5-HT_{1B/1D} tal como eletriptán, sumatriptán, zolmitriptán o rizatriptán;

- un antagonista del receptor 5-HT_{2A}, tal como R(+)-alfa-(2,3-dimetoxi-fenil)-1-[2-(4-fluorofeniletíl)]-4-piperidinametanol (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;
- 5 • Tramadol®;
- un inhibidor de 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-metilendioxfenil)-piracino[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-etilpiperazin-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-metoxibencil)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-pirazol[4,3-d]pirimidin-5-il)-N-[2-(1-metilpirrolidin-2-il)etil]-4-propoxibencenosulfonamida;
 - un cannabinoide;
 - antagonista del receptor metabotrópico de glutamato subtipo 1 (mGluR1);
 - un inhibidor de la recaptación de serotonina, tal como sertralina, metabolito de sertralina desmetilsertralina, fluoxetina, norfluoxetina (metabolito de desmetilfluoxetina), fluvoxamina, paroxetina, citalopram, metabolito de citalopram desmetilcitalopram, escitalopram, d,1-fenfluramina, femoxetina, ifoxetina, cianodotiepina, litoxetina, dapoxetina, nefazodona, cericlamina y trazodona;
 - un inhibidor de la recaptación de noradrenalina (norepinefrina), tal como maprotilina, lofepramina, mirtazapina, oxaprotilina, fezolamina, tomoxetina, mianserina, bupropión, metabolito de bupropión hidroxibupropión, nomifensina y viloxazina (Vivalan®), especialmente un inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina, tal como reboxetina, en concreto (S,S)-reboxetina;
 - un inhibidor dual de la recaptación de serotonina-noradrenalina, tal como venlafaxina, metabolito de venlafaxina O-desmetilvenlafaxina, clomipramina, metabolito de clomipramina desmetilclomipramina, duloxetina, milnaciprán e imipramina;
 - un inhibidor de la óxido nítrico sintasa inducible (iONS) tal como 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, ácido (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-piridincarbonitrilo; 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-tiazolbutanol, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil) butil]tio]-6-(trifluorometil)-3 piridincarbonitrilo, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-5-clorobenzonitrilo, N-[4-[2-(3-clorobencilamino)etil]fenil]tiofeno-2-carboxamidina, o guanidinoetildisulfuro;
 - un inhibidor de la acetilcolinesterasa, tal como donepecilo;
 - un antagonista de la prostaglandina E₂ subtipo 4 (EP4), tal como ácido N-[[[2-[4-(2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)fenil] etil] amino)-carbonil]-4-metilbencenosulfonamida o 4-[[[1S)-1-[[[5-cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil]amino]etil]benzoico;
- 40 • un antagonista de leucotrieno B₄; tal como ácido 1-(3-bifenil-4-ilmetil-4-hidroxi-croman-7-il)-ciclopentanocarboxílico (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);
- 45 • un bloqueador de los canales de sodio, tal como lidocaína; o
- un antagonista de 5-HT₃, tal como ondansetrón;

y las sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- [0067]** De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se da a conocer un método de tratamiento, prevención, mejora, control, reducción de la incidencia o retraso del desarrollo o de la evolución del dolor o de cualquiera de los dolores anteriores en un individuo, comprendiendo la administración al individuo de una cantidad efectiva de la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con el primer o segundo aspecto o las

formas de realización preferidas de la misma, o la molécula de ácido nucleico o el vector de acuerdo con el tercer y cuarto aspectos.

[0068] La presente invención se puede aplicar tanto al campo médico humano como al veterinario. 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 individuo es un humano.

[0069] De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención, se da a conocer una composición farmacéutica para uno o más de entre el tratamiento, la prevención, la mejora, el control, la reducción de la incidencia o el retraso del desarrollo o evolución del dolor o de cualquiera de los dolores anteriores, que comprende la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con el primer o segundo aspecto o las formas de realización preferidas de la misma, o la molécula de ácido nucleico o el vector de acuerdo con el tercer y cuarto aspectos y un portador farmacéuticamente aceptable y/o un excipiente.

[0070] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con el primer o segundo aspectos o las formas de realización preferidas de la misma, o la molécula de ácido nucleico o el vector según el tercer y cuarto aspecto o la composición farmacéutica del octavo aspecto está preparada o resulta adecuada para su 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.

[0071] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con el primer o segundo aspecto o las formas de realización preferidas de la misma, o la molécula de ácido nucleico o el vector según el tercer y cuarto aspecto, o la composición farmacéutica del octavo aspecto está preparada o resulta adecuada para su administración antes y/o durante y/o después del comienzo del dolor o para dicha utilización.

[0072] Preferiblemente, la p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con el primer o el segundo aspecto o las formas de realización preferidas de la misma, o la molécula de ácido nucleico o el vector según el tercer y el cuarto aspecto o la composición farmacéutica del octavo aspecto se destina o se prepara 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 período 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 período que incluye, aunque sin carácter limitativo: 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.

[0073] Más preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con el primer o segundo aspecto o las formas de realización preferidas de la misma, o la molécula de ácido nucleico o el vector de acuerdo con el tercer y cuarto aspecto, o la composición farmacéutica del octavo aspecto está pensada o está preparada para administrarse de forma secundaria por medio de una vía que incluye, aunque sin carácter limitativo, una o más de: la vía oral, sublingual, bucal, tópica, rectal, inhalatoria, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial o intramuscular, intracardíaca, intraósea, intradérmica, intraperitoneal, transmucosa, vaginal, intravítrea, epicutánea, intraarticular, periarticular o local.

[0074] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con el primer o segundo aspecto o las formas de realización preferidas de la misma, o la molécula de ácido nucleico o el vector según el tercer y cuarto aspecto o la composición farmacéutica del octavo aspecto está pensada o preparada para su administración con una concentración de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 200 mg/ml; preferiblemente con cualquiera de aproximadamente 0,05, 0,1, 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 un 10 % de error, más preferiblemente con aproximadamente 3 mg/ml en aplicaciones veterinarias y 0,1 en humanos.

[0075] Preferiblemente, la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con el primer o el segundo aspecto o las formas de realización preferidas de la misma, o la molécula de ácido nucleico o el vector según el tercer y cuarto aspecto o la composición farmacéutica del octavo aspecto está destinada o preparada para su administración con una concentración de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal; preferiblemente, con 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 aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal +/- aproximadamente un 10 % de error, más preferiblemente con aproximadamente 10 mg/kg en aplicaciones veterinarias y 0,3 en humanos.

De acuerdo con un noveno aspecto de la presente invención, se da a conocer un kit que comprende:

(a) la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc según el primer o segundo aspecto o las formas de realización preferidas de la misma, o la molécula de ácido nucleico o el vector de acuerdo con el tercer y cuarto aspecto o la composición farmacéutica del octavo aspecto; y

(b) instrucciones para la administración de una cantidad efectiva de dicha proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc, molécula de ácido nucleico, vector o composición farmacéutica a un individuo para lograr uno o más de entre la prevención o el tratamiento del dolor, o bien para mejorar, controlar, reducir la incidencia o retrasar el desarrollo o la evolución del dolor.

5 **[0076]** El kit puede incluir uno o más recipientes que contengan la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc, 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 usos de la invención. El kit puede comprender, además, una descripción de la selección de un individuo adecuado para el tratamiento basada en identificar si ese individuo presenta un dolor o un síntoma de dolor o corre el riesgo de tenerlo. Las instrucciones para la administración de la composición farmacéutica pueden incluir información en cuanto a la dosis, el esquema de dosificación y las vías de administración para el tratamiento previsto.

10 **[0077]** De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se da a conocer la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc según el primer o segundo aspecto o las formas de realización preferidas de la misma, o la molécula de ácido nucleico o el vector según el tercer y cuarto aspecto o la composición farmacéutica del octavo aspecto para su utilización en una o más de entre la prevención o el tratamiento, o bien para mejorar, controlar, reducir la incidencia o retrasar el desarrollo o evolución de una afección o los síntomas de una afección asociada a una o más de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 o NT-4/5.

– El *NGF* (*factor de crecimiento nervioso*) se une a al menos dos clases de receptores: el p75NTR y el TrkA, una tirosina quinasa transmembrana, implicado en el crecimiento axonal, la ramificación y el alargamiento. Se conocen afecciones y síntomas asociados al NGF. El NGF se expresa en condiciones inflamatorias y en el dolor y se asocia a los mismos [Secuencia proteica NP_002497.2, NP_038637]. Además, se ha demostrado que el NGF desempeña una función en varias 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 a 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 las heridas, y hay pruebas de que podría resultar útil para el tratamiento de úlceras cutáneas y úlceras corneales; se ha demostrado que reduce la degeneración neuronal y estimula la regeneración nerviosa periférica en ratas.

– El *BDNF* (*factor neurotrófico derivado del cerebro*) es una neurotrofina que ayuda a la supervivencia y al crecimiento neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso [Secuencia proteica NP_001137277.1, NP_001041604]. El BDNF une los receptores de la superficie celular TrkB y p75NTR, y también modula la actividad del receptor nicotínico alfa 7. Se conocen afecciones y síntomas asociados al BDNF. Se ha demostrado que el BDNF desempeña una función significativa en la transmisión de dolor fisiológico y patológico, especialmente en modelos de dolor agudo, dolor inflamatorio y dolor neuropático, donde se ha descubierto que la síntesis de BDNF aumenta de forma considerable; también se ha demostrado que el BDNF se regula al alza en afecciones con dolor crónico, así como en otras afecciones, tales como eccema y psoriasis. La regulación a la baja 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 en la bulimia nerviosa.

– La *neurotrofina-4* (*NT-4*), también conocida como *neurotrofina-5* (*NT-5*), es un factor neurotrófico que transmite una señal 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 humanos, cerdos, ratas y ratones. [Secuencia proteica NP_006170, NP_937833]. La NT-4 es sintetizada por la mayoría de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD), y las de los ganglios simpáticos paravertebrales y prevertebrales, el asta dorsal y el asta ventral de la médula espinal, y se encuentra expresada en muchos tejidos, incluidos la próstata, el timo, la placenta y el músculo esquelético. Se conocen afecciones y síntomas asociados a la NT-4/5. Los defectos en NT4/5 están relacionados con 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 implicada en sistemas de señalización del dolor, tales como dolor nociceptivo; se observa también regulación al alza de NT-4/5 en enfermedades inflamatorias crónicas de la piel, tales como dermatitis, eccema o lesiones pruriginosas de dermatitis atópica. La regulación a la baja de NT-4/5 se observa en la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Huntington.

– La *neurotrofina-3* (*NT-3*) es una neurotrofina que está relacionada desde el punto de vista estructural con la 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 afecciones y síntomas asociados a la NT3. Los ratones con deficiencia de NTF3 generados mediante inserción dirigida de un gen (*gene targeting*) muestran

defectos graves en el movimiento de las extremidades. La NT-3 transmite una señal a través de los receptores Trk y estimula el crecimiento y la supervivencia de las células nerviosas y gliales [Secuencia proteica NP_001096124.1 y NP_032768]. Las secuencias de aminoácidos de la NT-3 humana, de ratón y de rata son idénticas. Se sabe que la NT3 y su receptor específico, la tirosina quinasa C (TrkC), modulan el dolor neuropático y el dolor nociceptivo, así como el mecanismo de nocicepción y propiocepción; por ejemplo, la expresión de NT3 aumenta en las células pequeñas del GRD de animales neuropáticos. La expresión de NT3 se asocia también a neuropatías, tales como la polineuropatía diabética, la neuropatía relacionada con el VIH y la neuropatía de fibras grandes, incluida la atrofia. También está relacionada con el desarrollo de hiperalgesia (una disminución en el umbral de un estímulo nocivo normal), la alodinia (un estímulo no nocivo se torna nocivo), y el dolor espontáneo (dolor en ausencia aparente de estímulos), y es un modulador conocido del dolor muscular.

[0078] A continuación, se describirá la invención con referencia a los siguientes ejemplos, que se exponen para ilustrar la invención, y no para limitarla.

Ejemplos

15 **Pruebas de inmunogenicidad *in silico* para secuencias de p75NTR-Fc**

[0079] Actualmente, se emplea la tecnología de ADN recombinante para producir un amplio abanico de fármacos de origen biológico, incluyendo la clase novedosa de proteínas de fusión terapéuticas multifuncionales basadas en el Fc (fragmento cristalizante) de anticuerpos monoclonales (mAb) (Huang 2009 Curr Opin Biotechnol, 20(6), 692-9). La fusión de una proteína terapéutica a un dominio Fc realza el efecto terapéutico global del producto biofarmacéutico mediante la ampliación de la vida media sérica de la molécula de dos maneras distintas. En primer lugar, el reciclado de la fusión Fc mediante unión dependiente al pH al receptor Fc neonatal (FcRn) reduce la degradación de la proteína terapéutica en endosomas. En segundo lugar, el incremento del tamaño molecular a través tanto de la adición de los dominios Fc como de la dimerización mediada por Fc en la proteína terapéutica ayuda a limitar el aclaramiento renal relativo a la molécula terapéutica.

[0080] Se pueden crear proteínas de fusión uniendo directamente dos o más dominios. No obstante, esto puede dar como resultado propiedades moleculares no deseables en la proteína de fusión resultante, como una bioactividad alterada (Bai *et al.* 2005 Proc. Natl. Acad. Sci. 102 7292-7296), un mal plegamiento de proteínas (Zhao *et al.* 2008 Protein Expr. Purif. 61, 73-77) o rendimientos de producción bajos (Amet *et al.* 2009 Pharm. Res. 26, 523-528). Se puede insertar una secuencia conectora entre los dominios para abordar estos potenciales problemas, pero se deben tener en cuenta varios factores a la hora de elegir el conector apropiado. En primer lugar, el conector debe reflejar la función prevista general de los dominios en la proteína de fusión. En algunas situaciones, los dominios deben funcionar de manera independiente, por lo que es deseable que el conector presente flexibilidad. En cambio, puede ser necesario un conector rígido si los dominios van a estar conectados. En segundo lugar, el conector no debe introducir ninguna funcionalidad no deseada en la proteína de fusión, a través de modificaciones postraduccionales (PTM, por sus siglas en inglés). Por último, se debe considerar la potencial inmunogenicidad del conector y las regiones flanqueantes del conector, ya que el conector puede ser una secuencia diseñada *de novo* que no se origine de manera natural en el cuerpo humano.

[0081] La mayoría de proteínas terapéuticas son, en mayor o menor grado, inmunogénicas (Van Walle *et al.* 2007 Expert Opin Biol Ther. 7(3):405-18, Stas *et al.* 2009 Immunogenicity assessment of antibody therapeutics. Cambridge University Press, Cambridge), e incluso los denominados productos terapéuticos a base de anticuerpos totalmente humanos pueden contener regiones inmunogénicas (Harding *et al.* 2010 MAbs. 2, 256-265). La inmunogenicidad es la capacidad para inducir una respuesta Th (T auxiliar), que se desencadena cuando un único receptor de células T reconoce a un péptido unido a las moléculas HLA de clase II mostradas en células que presentan antígenos. Los péptidos se generan a partir de proteínas internalizadas por la célula que presenta el antígeno, y que posteriormente se procesan a través de la vía de escisión endosomal. La superficie celular presentará únicamente péptidos con una afinidad suficiente a las moléculas HLA de clase II, y es posible que pudieran desencadenar una respuesta Th.

[0082] Como consecuencia, se puede reducir el potencial de inmunogenicidad eliminando epítomos Th, proceso conocido como desinmunización (Chamberlain 2002 The Regulatory Review 5, 4-9, Baker y Jones 2007 Curr Opin Drug Discov. Devel. 10, 219-227). Esto se consigue prediciendo qué péptidos se pueden unir en la proteína terapéutica a las moléculas HLA de clase II y, posteriormente, introduciendo sustituciones que eliminen o reduzcan la afinidad de unión del péptido a las moléculas HLA de clase II.

[0083] Existen varios genes HLA de clase II, y prácticamente todos son altamente polimórficos. Por otro lado, las moléculas HLA de clase II constan de una cadena alfa y beta, cada una derivada de un gen distinto que, con su polimorfismo inherente, incrementa más la variación. En concreto, cada individuo expresa los genes: DRA/DRB, DQA/DQB y DPA/DPB. De estos, solo DRA es no polimórfico. Además, puede haber presente también un «segundo» gen DRB (DRB3, DRB4 o DRB5), cuyo producto se asocia también a la cadena DRA.

[0084] Durante un proceso de desinmunización, el foco se sitúa en los alotipos DR, que se sabe que se expresan a mayor nivel que DQ y DP (Laupeze *et al.* 1999 Hum. Immunol. 60, 591-597, Gansbacher y Zier 1988 Cell Immunol. 117, 22-34, Berdoz *et al.* 1987 J. Immunol. 139, 1336-1341, Stunz *et al.* 1989 J. Immunol. 143, 3081-

3086). Los alotipos DR se suelen denominar por el gen DRB, ya que el gen DRA se mantiene constante; por ejemplo, DRB1*01:01, donde los dígitos son específicos del alelo.

[0085] La evaluación de la gravedad de epítomos individuales se basa en los criterios de promiscuidad, esto es, el número de alotipos HLA a los que se une un epítomo específico, así como la importancia (frecuencia) de los alotipos en la población, y una evaluación cualitativa de la fuerza de unión del complejo HLA:péptido. Puesto que la población de células T de un individuo se ha seleccionado para no reconocer «autopéptidos», se puede determinar la presencia de péptidos en la proteína que esté siendo desinmunizada que correspondan a autopéptidos (conocidos) que normalmente no deberían inducir una respuesta Th. Aunque no se conoce con detalle qué proteínas endógenas se internalizan durante la maduración de células T, y puesto que estas dan lugar a autopéptidos, los anticuerpos se encuentran entre ellas (Kirschmann *et al.* 1995 J. Immunol. 155, 5655-5662, Verreck *et al.* 1996 Immunogenetics 43, 392-397, Harding *et al.* 2010 MAbs. 2, 256-265).

Diseño de la proteína de fusión p75-NTR Fc

[0086] El alotipo concreto de la porción Fc de la proteína de fusión p75-NTR Fc era el vector IgGza de IgG pCon (ver arriba).

[0087] El diseño de una proteína de fusión p75-NTR Fc se llevó a cabo en varias etapas:

- Se definió el constructo exacto de la secuencia p75-NTR que se iba a utilizar en la proteína de fusión Fc. Se consideraron varios factores, entre ellos:
 - La fusión p75-NTR Fc debería ser capaz de unirse a varias neurotrofinas, incluyendo al menos NGF, BDNF, NT-3 y NT-4; se debe conservar la flexibilidad en la proteína de fusión p75-NTR Fc.
 - Los sitios de escisión no deseados de alfa-secretasa están presentes en el dominio extracelular de p75-NTR-Fc (SEQ ID N.º 1), y estos se deben eliminar de la secuencia, puesto que se someterán a escisión, y, como consecuencia, reducirán la actividad biológica y el perfil PK del producto p75-Fc *in vivo*. El producto p75-Fc original (véase la SEQ ID N.º 1) contenía sitios de escisión de alfa-secretasa y, por consiguiente, la vida media y la actividad biológica (PK/PD) se redujo significativamente en comparación con la SEQ ID N.º 3 (véase más adelante).

[0088] Se identificaron conectores empíricos apropiados, adecuados para su uso con el fin de unir el dominio extracelular de p75-NTR y la Fc en una proteína de fusión p75-NTR Fc. Se excluyeron las secuencias conectoras que contenían sitios que podían participar potencialmente en modificaciones postraduccionales (PTM).

[0089] Se formaron diversas variantes de la proteína de fusión p75-NTR Fc *in silico* empleando el constructo definido de p75-NTR con la porción apropiada de la región Fc utilizando distintas secuencias conectoras posibles. Se intentó llevar a cabo un modelado estructural y un análisis del C-terminal del dominio extracelular de p75-NTR, la región bisagra Fc y el conector potencial (ver tabla 1).

[0090] Se determinó la presencia de posibles epítomos Th en las variantes con distintas secuencias conectoras utilizando Epibase™.

[0091] Se propuso la proteína de fusión p75-NTR Fc expresada en la secuencia 3 (SEQ ID No. 3) basándose en el riesgo de inmunogenicidad previsto.

Análisis secuencial de la proteína de fusión Fc

[0092] Las secuencias proteicas para trece de las proteínas de fusión Fc terapéuticas disponibles en la actualidad se obtuvieron a partir del sitio web de los nombres adoptados por los Estados Unidos (United States Adopted Names, USAN) (<http://www.ama-assn.org/ama/pub/physician-resources/medical-science/>). Cuando fue posible, las secuencias proteicas se cotejaron y se comprobaron comparándolas con otros recursos electrónicos, como sitios web sobre información de patentes en línea. Las secuencias proteicas para proteínas de fusión Fc de carácter investigador se obtuvieron a partir de otros proveedores comerciales empleando recursos en línea.

[0093] Con el fin de identificar la secuencia parental putativa de la que derivaron las diversas proteínas de fusión Fc, las secuencias proteicas de fusión Fc se alinearon con los productos proteicos traducidos de los vectores IgG pCon propios de Lonza utilizando MAFFT (Kato *et al.* 2002 Nucleic Acids Res. 30, 3059-3066). Las secuencias proteicas de fusión Fc alineadas se truncaron a continuación en la posición en la que comenzó la fusión Fc para coincidir con la secuencia IgG. Para determinar dónde se inició la secuencia IgG, se utilizó un criterio de tres residuos de IgG consecutivos.

[0094] Se realizó una búsqueda de Blast (Altschul *et al.* 1997 Nucleic Acids Res. 25 3389-3402) de una copia propia de la base de datos Uniprot (The UniProt Consortium, lanzamiento de UniProt 2012-09 - 3 de octubre, 2012) utilizando las secuencias proteicas de fusión Fc truncadas sin su secuencia IgG con el fin de identificar las secuencias proteicas coincidentes más cercanas. A continuación, cada secuencia proteica de fusión Fc se volvió a alinear manualmente tanto con las secuencias coincidentes más cercanas halladas en la base de datos Uniprot como con la secuencia IgG pCon de Lonza coincidente más cercana. Posteriormente, se extrajeron las uniones entre los miembros de fusión y las regiones Fc, y se crearon dos conjuntos, uno para las 13 proteínas de fusión

Fc terapéuticas y otro para las proteínas de fusión Fc disponibles comercialmente. Finalmente, a partir de estos dos conjuntos, se identificaron las regiones de enlace.

[0095] El conjunto de secuencias de proteínas de fusión Fc disponibles en el mercado se truncó a continuación en la posición N-terminal donde se halló la identidad de secuencias con la secuencia IgG pCon de Lonza coincidente más cercana. Posteriormente, las secuencias truncadas se clasificaron, y se generó un conjunto de secuencias no redundante.

Perfil inmunológico con Epibase™

[0096] El perfil inmunológico con Epibase™ se llevó a cabo en las variantes de la proteína de fusión Fc utilizando los 85 alotipos HLA de clase II en el conjunto global.

[0097] Resulta muy difícil establecer una comparación de las variantes de la proteína de fusión Fc con respecto a su riesgo inmunogénico empleando únicamente predicciones de unión de HLA. Esto se debe a que no se tienen en cuenta varios factores importantes:

- El péptido de unión puede no generarse por medio del mecanismo de procesamiento y, por lo tanto, nunca estaría expuesto como un complejo péptido-HLA a células Th mediante las células que presentaban antígenos.
- El complejo péptido-HLA puede no ser reconocido por una célula Th.

[0098] Dadas estas consideraciones, se pueden realizar tres tipos de comparaciones cuantitativas entre secuencias variantes utilizando el perfil inmunológico de Epibase™. En primer lugar, se puede comparar el número de epítomos críticos para cada uno de los conjuntos de alotipos DRB1, DRB3/4/5, DQ y DP, uniéndose los péptidos a múltiples alotipos del mismo grupo considerados como uno solo. Dicho recuento de epítomos muestra el número de epítomos únicos en cada conjunto, y la diferencia entre las variantes revela la eliminación o adición completa de posibles epítomos Th.

[0099] Puesto que muchos epítomos, especialmente los epítomos promiscuos, se unen a múltiples alotipos, el cambio en el recuento de epítomos Th únicos puede ocultar la reducción o el incremento real del potencial de inmunogenicidad entre variantes. Por consiguiente, la segunda comparación cuantitativa se realiza a nivel de cada alotipo HLA en la totalidad de epítomos Th, donde un recuento de los péptidos de unión por alotipo para las variantes, junto con el serotipo y la frecuencia de población, permite una comparación a nivel de serotipo o de alotipo. En tercer lugar, se puede calcular una puntuación aproximada que exprese un riesgo inmunogénico para el peor de los casos de la siguiente manera:

$$\text{puntuación} = \sum (\text{recuento de epítomos} \times \text{frecuencia de alotipos})$$

[0100] El producto multiplicativo para cada alotipo afectado se calcula a partir del número de epítomos que se predijo que se unirían a un alotipo determinado, y la frecuencia alélica del alotipo afectado. Los productos se suman para todos los alotipos DRB1, DRB3/4/5, DQ y DP afectados empleados en el estudio. Cabe destacar que las puntuaciones de alotipos individuales no suponen la métrica absoluta mediante la cual se puede medir el riesgo de inmunogenicidad, ya que se deberían tener en cuenta todos los alotipos HLA elegidos (DRB1, DRB3/4/5, DQ y DP).

[0101] No se consideró que las secuencias de la línea germinal de anticuerpos humanos, tales como las derivadas de la Fc de pCon IgG de Lonza, fueran inmunogénicas, ya que se encuentran en el grupo de anticuerpos circulantes presentes en el sistema inmunológico humano, y se pueden considerar autopéptidos. Del mismo modo, no se considera que p75-NTR sea intrínsecamente inmunogénico, ya que se expresa de manera natural en el cuerpo humano. Como consecuencia, los epítomos críticos resultantes de péptidos derivados completamente de secuencias de la línea germinal de anticuerpos humanos o de p75-NTR se excluyen de los recuentos y de las puntuaciones de inmunogenicidad presentados.

Modelado estructural

[0102] Los modelos estructurales de la proteína de fusión p75-NTR Fc propuesta se generaron utilizando la plataforma de modelado de Lonza. Se puntuaron los fragmentos de patrón estructural del candidato para la porción p75-NTR y Fc, se clasificaron y se seleccionaron tanto de una base de datos de anticuerpos propios como del Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank, PDB), por su identidad de secuencias, así como por las medidas cristalográficas cualitativas de la estructura del patrón, tal como la resolución (en ángstrom (Å)).

[0103] Se generó un alineamiento de secuencias de los fragmentos del patrón estructural con la proteína de fusión p75-NTR Fc. Los fragmentos del patrón, así como el alineamiento de secuencias, se procesaron mediante MODELLER (Sali *et al.* 1993 J. Mol. 234, 779-815). Este protocolo crea restricciones conformacionales derivadas del conjunto de patrones estructurales alineados. Se crea un conjunto de estructuras que satisfacen las restricciones mediante gradiente conjugado y procesos simulados de optimización de hibridación. Se selecciona uno o varios modelos de estructuras de este conjunto basándose en una fuente de energía, derivado(s) de la

puntuación de la estructura proteica y de la satisfacción de las restricciones conformacionales. Los modelos se examinaron, y las cadenas laterales de las posiciones que diferían entre la diana y el patrón se optimizaron empleando un algoritmo de optimización de la cadena lateral, con energía minimizada. Se utilizó un paquete de programas de visualización y herramientas informáticas para evaluar la variabilidad conformacional de las estructuras, así como el empaquetamiento local y del núcleo de los dominios para seleccionar uno o varios modelos preferidos.

Diseño de la proteína de fusión p75-NTR Fc

[0104] Se diseñaron tres variantes de conector de las proteínas de fusión p75-NTR Fc. Debido a las restricciones de diseño presentes al tratar de conservar la flexibilidad en las regiones p75-NTR en las proteínas de fusión Fc finales y al deseo de evitar sitios de escisión no deseables para la alfa-secretasa y gamma-secretasa, se truncó la secuencia p75-NTR extracelular en la posición G237. La secuencia 1 original de p75NTR-Fc (SEQ ID N.º 1) se truncó en la posición A250. Se han identificado sitios de escisión de alfa-secretasa en la porción extracelular de p75-NTR entre las posiciones 241-242 y las posiciones 244-245 (Zampieri *et al.* 2005 J Biol Chem. 280, 14563-71) y se ha inferido un sitio de escisión putativo de gamma-secretasa mediante homología de secuencias en las regiones de la posición 282. Resulta evidente, a raíz del PK/PD de la secuencia 1, que el PK y la actividad biológica de la secuencia 1 (SEQ ID N.º 1) se ha reducido de manera significativa en comparación con la secuencia 3 (SEQ ID N.º 3). A partir de estos experimentos, se concluyó que los sitios de alfa-secretasa y gamma-secretasa contribuían a reducir la actividad *in vivo*.

[0105] Los requisitos fundamentales de los conectores elegidos para las variantes son permitir la flexibilidad del miembro de fusión en la proteína de fusión Fc, evitar la introducción de cualquier residuo que pueda portar modificaciones postraduccionales, y mantener un riesgo de inmunogenicidad bajo.

[0106] Existen dos tipos de conectores disponibles para unir la p75-NTR a la región constante Fc, conectores empíricos y conectores derivados de proteínas naturales. Los conectores derivados de proteínas naturales pueden introducir sitios que pueden portar modificaciones postraduccionales no deseables y, debido a su naturaleza, conllevar posiblemente un mayor riesgo de introducción de inmunogenicidad. Los conectores empíricos fueron impulsados para investigaciones posteriores debido a estos motivos, y se pueden clasificar en términos generales como flexibles o rígidos. Las secuencias de los conectores empíricos de la unidad de repetición se listan a continuación, junto con su clasificación de flexibilidad:

- (G₄S)_x - flexible
- G_x - flexible
- A(EAAAK)_xA - rígido (SEQ ID N.º 14)
- (PA)_x - rígido

[0107] Debido a la necesidad de flexibilidad para asegurar la unión a varios ligandos neurotróficos, incluyendo al menos NGF, BDNF, NT3 y NT4 en la proteína de fusión Fc final, únicamente se consideraron conectores flexibles.

[0108] En función de estas consideraciones, se construyeron tres variantes, una variante utilizando un conector de poliglicina y dos variantes utilizando el conector de tetraglicina y serina. Todas las variantes consideran que G209 (proteína expresada, véase la secuencia 3 (SEQ ID N.º 3)) forma parte de la secuencia conectora en la secuencia p75-NTR original. Además, las variantes contienen la mutación de cisteína a serina en la ubicación equivalente a la posición 222 en la secuencia 1 (SEQ ID N.º 1) de la proteína de fusión p75-NTR Fc original. Las regiones de enlace de las variantes se muestran en la figura 5.

[0109] Se llevó a cabo un análisis del potencial de inmunogenicidad para cada una de las variantes y las otras secuencias que se indican en la figura 1 utilizando Epibase™. Las puntuaciones de inmunogenicidad previstas para los epítomos críticos que afectan a los 85 alotipos HLA de clase II en el conjunto global se muestran más adelante, en la tabla 1. Asimismo, la tabla 1 presenta también información acerca del número de alotipos afectados por epítomos no críticos.

Tabla 1: Resumen de las puntuaciones calculadas de epítomos críticos

Molécula	Puntuación de epítomo crítico				Epítomos no críticos
	DRB1	DRB3/4/5	DQ	DP	
p75-Fc comercial	167,7	53,6	0	0	-

Molécula	Puntuación de epítipo crítico				Epítopos no críticos
	DRB1	DRB3/4/5	DQ	DP	
p75-Fc	55,1	24,2	0	0	-
p75-Fc (C222S)	75	24,2	0	0	-
p75-Fc (G4x1) (SEQ ID N.º 3)	0	0	0	0	7 epítopos DQ medios
p75-Fc (G4Sx1)	2,4	0	0	0	1 epítipo DRB1 medio, 5 epítopos DQ medios
p75-Fc (G4Sx2)	2,4	0	42,2	0	3 epítopos DQ fuertes, 1 epítipo DRB1 medio, 6 epítopos DQ medios
SEQ ID N.º 15	0	0	0	0	-
p75NTR-Fc de Apollo	167,7	53,6	0	0	-

[0110] Basándose en la inmunogenicidad prevista y en la ausencia de sitios que puedan portar modificaciones postraduccionales, la variante 1 (p75_Fc_G4x1) presenta las mejores características de las tres variantes, y se produjo para pruebas *in vivo*.

Afinidad de p75NTR-Fc por NGF en la secuencia 1 (SEQ ID N.º 1) y en la secuencia 3 (SEQ ID N.º 3)

5 **[0111]** Se preparó un chip de Biacore en un experimento en el que la proteína A se unía a las células de flujo 1 y 2 mediante acoplamiento de aminas. Se midió la cinética de ciclo único de la unión de NGF a la p75-Fc capturada.

10 **[0112]** La capacidad de unión ($R_{m\acute{a}x}$) de una superficie de chip depende del nivel inmovilizado del ligando (proteína de fusión). Para un estudio cinético, se recomienda una $R_{m\acute{a}x}$ de 50-100 RU. Al utilizar los pesos moleculares de p75-Fc y NGF, se puede calcular un nivel de inmovilización deseado para la proteína de fusión.

$$R_{m\acute{a}x} = (\text{peso molecular de NGF/peso molecular de la proteína de fusión}) \times \text{nivel de inmovilización} \times \text{relación estequiométrica: } 50 = (13\ 500/102\ 000) \times \text{nivel de inmovilización} \times 1$$

15 **[0113]** Por consiguiente, el nivel de inmovilización requerido = $(102\ 000/13\ 500) \times 50 = 378$ RU. p75NTR-Fc y NTR-Fc de la secuencia 1 (SEQ ID N.º 1) y de la secuencia 3 (SEQ ID N.º 3) se inmovilizaron en el chip de proteína A con anterioridad a la cinética de ciclo único.

20 **[0114]** Mediante una operación manual, se capturó la p75-Fc de la secuencia 3 (SEQ ID N.º 3) en la célula de flujo 2 del chip de proteína A hasta que se alcanzó el nivel deseado de aproximadamente 380 RU. Esto se llevó a cabo mediante una inyección de 22 segundos con una velocidad de flujo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ y una concentración de p75-Fc en la secuencia 3 (SEQ ID N.º 3) de 10 mg/ml, que dio como resultado 418 RU de la proteína de fusión capturada en la superficie de la proteína A.

[0115] En el primer caso, se analizaron las concentraciones de NGF de 10, 5, 2,5, 1,25 y 0,625 nM. Se analizaron estas concentraciones debido a que la K_D para la proteína de fusión se encontraba, aproximadamente, dentro de este intervalo de concentraciones de NGF.

[0116] El método cinético de ciclo único implicaba:

- 25
- inyectar 0,625 nM de NGF en la p75-Fc capturada durante 120 segundos a 30 $\mu\text{l}/\text{min}$
 - posteriormente, este proceso se repitió con una inyección de NGF a 1,25 nM, y a continuación de 2,5, 5 y 10 nM

- tras haber inyectado la concentración final de NGF, se realizó una fase de disociación de 600 segundos haciendo fluir el tampón del análisis (HBS-EP) sobre el chip.

[0117] Una vez completado, el chip se regeneró de nuevo a su superficie de proteína A inyectando 10 mM de HCl de glicina, pH 2 durante 60 segundos a 30 µl/min.

- 5 **[0118]** A continuación, se capturó la p75-Fc de la secuencia 1 (SEQ ID N.º 1) en el chip realizando una inyección de 38 segundos con una velocidad de flujo de 10 µl/min y una concentración de 10 µg/ml. Se alcanzó el nivel deseado de 430 RU. A continuación, se repitió el proceso cinético de ciclo único descrito anteriormente.

Análisis de datos

- 10 **[0119]** Los datos de unión proteína de fusión-NGF se analizaron de la siguiente manera utilizando el *software* de evaluación Biacore T200 v1:

- Los datos se registraron para la unión de NGF a la proteína de fusión en la célula de flujo 2 (Fc=2) y para que NGF fluyera sobre la célula de flujo control 1 (Fc=1; proteína A única).
- Los datos de Fc=1 se restaron a continuación de Fc=2 para obtener datos de unión «2-1».
- Los datos de unión 2-1 para una inyección de 0 nM (tampón del análisis único HBS-EP) se restaron a continuación de todos los datos de unión 2-1 para controlar cualquier desviación respecto al valor de referencia a lo largo del experimento.
- Por último, se ajustaron estos datos a un modelo de unión 1:1 para calcular características de unión, incluyendo las tasas de asociación (ka), las tasas de disociación (kd) y las afinidades (K_D).

- 20 **Datos cinéticos de ciclo único de la unión de NGF a las proteínas de fusión p75-Fc capturadas de la secuencia 1 (SEQ ID N.º 1) y 3 (SEQ ID N.º 3)**

[0120] Los perfiles de unión de ambas proteínas de fusión a NGF fueron de 400 pM (SEQ ID N.º 1) y 360 pM (SEQ ID N.º 3). A raíz de estos estudios, resultó evidente que la secuencia 3 (SEQ ID N.º 3) presentaba una afinidad mayor a NGF que la secuencia 1 (SEQ ID N.º 1).

Farmacocinética *in vivo* de p75NTR-Fc de la secuencia 1 (SEQ ID N.º 1) y 3 (SEQ ID N.º 3)

- 25 **[0121]** En este estudio, se utilizaron ratas Wistar macho (de Charles River UK) que pesaban 120-150 g a su llegada. Se revisó cada animal a su llegada y, aparentemente, se mostraron sanos. Se asignaron de manera aleatoria a una jaula de dos individuos, y se le atribuyó a cada rata un único número de identificación marcado en la cola. Los animales se aclimataron a la unidad animal durante al menos 10 días antes del inicio del estudio en el día 0.

- 30 **[0122]** Una vez que las ratas se habían aclimatado a su entorno, se trasladaron a una sala de procedimientos/almacén, donde se llevaron a cabo todos los procesos *in vivo*. Los animales se mantuvieron iluminados mediante luces fluorescentes configuradas para proporcionar un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad (desde las 07.00 hasta las 19.00), conforme a la recomendación del Ministerio del Interior de Reino Unido en la Ley de Procedimientos Científicos en Animales (Animals (Scientific Procedures) Act) de 1986. Las salas se climatizaron, y se midió de manera rutinaria la temperatura del aire (21°C +/- 2°C) y la humedad relativa.

[0123] Se alimentó a las ratas con una dieta a base de alimentos irradiados (Scientific Animal Food and Engineering, Augy, Francia), y disponían de agua esterilizada en el autoclave *ad libitum* a lo largo del estudio. Se comprobó y se examinó la composición y los contaminantes de cada lote de alimentación de manera sistemática. Los nidos y las jaulas se esterilizaron en el autoclave, y se ventiló cada jaula individualmente (sistema IVC).

- 40 **[0124]** El diseño del estudio se realizó de tal manera que había 5 grupos de tratamiento, según se indica en la tabla 2.

Tabla 2: Grupos de tratamiento

Número de rata	Tratamiento	Dosis	Vía de administración	Días de tratamiento	n
1 - 4	p75-Fc de la Sec. 1	1 mg/kg	Subcutánea	0,5 y 10	4
5 - 8	p75-Fc de la Sec. 2	1 mg/kg	Subcutánea	0,5 y 10	4

[0125] Se extrajo una muestra de sangre de la vena caudal de ratas, aproximadamente a la misma hora (10 am - 11.30 am) en los días 2, 4, 6, 8, 12 y 15, y se preparó el plasma.

- 45 **Toma de muestras de sangre de la vena caudal**

[0126] Las ratas se colocaron en una caja de calentamiento configurada a 38 °C durante un período de tiempo mínimo de cinco minutos pero no superior a diez minutos para inducir la vasodilatación de la vena caudal con el fin de facilitar el sangrado. Se confinó a las ratas en un inmovilizador con un tamaño apropiado, se pinchó la vena caudal utilizando una aguja esterilizada de 23 G, y se dejó fluir la sangre hacia un tubo Microvette CB 300 (Sarstedt 16.444). Se obtuvo un mínimo de 100 µl y un máximo de 300 µl de sangre de cada rata en todos los momentos. Se escogió un sitio distinto para repetir la toma de muestras, y las ratas se mostraron tranquilas durante el proceso. Las ratas toleraron bien la repetición de la toma de muestras de sangre, sin presentar signos de hematomas. La sangre obtenida se utilizó para preparar plasma.

Muestra de sangre final del corazón

[0127] Las muestras de sangre finales se tomaron mediante punción cardíaca con anestésico isoflurano con una jeringa Terumo de 1 ml y una aguja de 23 G. Los animales fueron sacrificados a continuación mediante dislocación cervical. La sangre obtenida se utilizó para preparar suero.

Preparación de plasma

[0128] El tubo Microvette que contenía sangre de la vena caudal se invirtió con cuidado varias veces para asegurar una mezcla correcta con el anticoagulante (potasio-EDTA). A continuación, se colocaron los tubos sobre hielo para centrifugarse a 2700 x g durante 10 minutos, y el plasma se dividió en alícuotas en tubos de polipropileno (dos alícuotas por animal por momento, excepto en el día 2, en el que se preparó únicamente una alícuota). Todas las muestras de plasma se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su uso.

Preparación de suero

[0129] Se dejó coagular la sangre extraída mediante punción cardíaca en el día 15 en un tubo de polipropileno a temperatura ambiente durante entre 2 y 3 horas (3 horas como máximo). Posteriormente, se centrifugó la sangre coagulada a 4000 x g durante 5 minutos, y el suero se dividió en alícuotas en tubos de polipropileno (dos alícuotas por animal). Las muestras de suero se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C.

Determinación de p75NTR-Fc en plasma

[0130] Se midió la p75NTR-Fc en plasma utilizando un ELISA modificado para p75NTR (sistemas R y D) y ELISA para Fc de IgG1 (sistemas R y D) como medio para determinar las concentraciones plasmáticas intactas totales de p75NTR-Fc.

[0131] Se determinó la farmacocinética de p75NTR-Fc de la secuencia 1 (SEQ ID N.º 1) y de la secuencia 3 (SEQ ID N.º 3).

	p75NTR-Fc de la secuencia 1 (SEQ ID N.º 1)	p75NTR-Fc de la secuencia 3 (SEQ ID N.º 3)
Ligando	NGF BDNF NT3/4	NGF BDNF NT3/4
PM	90-120 kDa	90-100 kDa
Kd de Biacore	390 pM	360 pM
T _{1/2} de la rata	1,5 días	3,3 días
T _{máx} de la rata	0,5 días	3 días
Eficacia en el dolor	10 mg/kg	1-3 mg/kg
C _{ef}	10 nM	2 nM

Conclusión

[0132] Al eliminar los sitios de escisión de la alfa-secretasa y gamma-secretasa de p75NTR-Fc de la secuencia 1 (SEQ ID N.º 1) en comparación con la secuencia 3 (SEQ ID N.º 3), esta ha mejorado significativamente el PK de p75NTR-Fc y, posteriormente, la eficacia evaluada mediante las puntuaciones de dolor tras un tratamiento crónico. Los sitios de escisión de la alfa-secretasa y gamma-secretasa de p75NTR-Fc de la secuencia 1 (SEQ ID

N.º 1) provocaron que este compuesto resultara inapropiado como fármaco *in vivo* para el tratamiento del dolor y de otras patologías relacionadas con la biología de las neurotrofinas; por ejemplo, enfermedades respiratorias.

[0133] La secuencia 3 (SEQ ID N.º 3) es estable, y presenta un mejor perfil de PK/PD en comparación con la secuencia 1 (SEQ ID N.º 1) y una mayor afinidad por las neurotrofinas.

5 **P75NTR-Fc (SEQ ID N.º 3) es analgésica.**

[0134] El objetivo del presente estudio era investigar los efectos de la exposición crónica de p75NTR-Fc (SEQ ID N.º 3) en la eficacia del dolor en la osteoartritis (OA) inducida por yodoacetato monosódico (MIA) en ratas.

[0135] Anteriormente, hemos mostrado también que se podría realizar una evaluación del dolor espontáneo midiendo la capacidad para soportar peso estático utilizando un medidor de incapacidad, y que esta guarda relación con la histopatología de la rodilla. Los estudios preclínicos que utilizan terapias novedosas para el dolor han sido criticados por su capacidad para inducir a sesgos en los datos. Con el fin de abordar este problema, se eligió de manera aleatoria tanto la rodilla izquierda como la rodilla derecha para la inducción de OA, y ningún operario de las tareas diarias *in vivo* conocía el estado de cada rodilla. Según se puede extraer de la bibliografía, la inducción de OA normalmente se lleva a cabo únicamente en la rodilla derecha, aunque en anteriores estudios no se hallaron diferencias sustanciales entre la inducción de OA en la rodilla izquierda frente a la rodilla derecha, independientemente del momento o de la dosis de MIA empleada.

Preparación de MIA

[0136] Se preparó MIA a 0,3 mg/50 µl de ETF-PBS (el volumen empleado para cada inyección intraarticular), que equivale a 6 mg/ml de solución madre. Se pesaron 302 mg de MIA y se disolvieron en 50,3 ml de ETF-PBS. El MIA se preparó un día antes, y se almacenó a 4 °C en oscuridad hasta el momento de su uso.

Animales

[0137] En este estudio, se utilizaron 44 ratas Wistar macho (de Charles River UK) que pesaban 110-130 g a su llegada. Se revisó cada animal a su llegada y, aparentemente, se mostraron sanos. Se asignaron de manera aleatoria a una jaula de dos individuos, y se le asignó a cada rata un único número de identificación marcado en la cola. Los animales se aclimataron a la unidad animal durante al menos 10 días antes del inicio del estudio en el día 0. Una vez que las ratas se habían aclimatado a su entorno, se trasladaron a una sala de procedimientos/almacén, donde se llevaron a cabo todos los procesos *in vivo*. Los animales se mantuvieron iluminados mediante luces fluorescentes configuradas para proporcionar un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad (desde las 07.00 hasta las 19.00), conforme a la recomendación del Ministerio del Interior de Reino Unido en la Ley de Procedimientos Científicos en Animales (Animals (Scientific Procedures) Act) de 1986. Las salas se climatizaron, y se midió de manera rutinaria la temperatura del aire (21 °C +/- 2 °C) y la humedad relativa.

[0138] Se alimentó a las ratas con una dieta a base de alimentos irradiados (Scientific Animal Food and Engineering, Augy, Francia), y disponían de agua esterilizada en el autoclave *ad libitum*. Se comprobó y se examinó de manera sistemática la composición y los contaminantes de cada lote de alimentación. Los nidos y las jaulas se esterilizaron en el autoclave, y se ventiló cada jaula individualmente (sistema IVC).

Diseño experimental

[0139] El diseño del estudio era tal que había cinco grupos de animales: anticuerpo humano de control (n=6), 0,3 mg/kg de p75NTR-Fc (SEQ ID N.º 3), 1 mg/kg de p75NTR-Fc (SEQ ID N.º 3), 3 mg/kg de p75NTR-Fc (SEQ ID N.º 3) y 3 mg/kg de PG-007 (anticuerpo anti-NGF biosimilar del Tanezumab de Pfizer).

[0140] Se administraron anticuerpos y p75NTR-Fc (SEQ ID N.º 3) mediante inyección subcutánea cada 5 días durante 25 días.

[0141] Se midió el peso corporal y se tomó una muestra de sangre de referencia de la vena caudal en la mañana del día -2. La capacidad para soportar peso estático de referencia se midió aproximadamente a la misma hora del día -1. En el día 0, de nuevo aproximadamente a la misma del día, todas las ratas se trataron con su respectivo anticuerpo o proteína de fusión p75NTR-Fc. Tres horas después, se les aplicó a todos los animales una inyección intraarticular de 0,3 mg de MIA en una rodilla (se inyectó ETF-PBS en la rodilla contralateral).

Aleatorización del tratamiento

[0142] Antes del comienzo del estudio, se pesaron las ratas y se asignó de manera aleatoria cada jaula de dos ratas a un grupo de tratamiento, de tal manera que el peso corporal medio de los animales en cada grupo era aproximadamente equivalente. Además de asignarse cada rata a un grupo de tratamiento concreto, se llevó a cabo también una aleatorización posterior, de modo que la inyección con MIA se realizó en cualquiera de entre la rodilla derecha o la rodilla izquierda de cada rata (inyectándose la rodilla contralateral de cada rata con ETFPBS). La asignación del grupo de tratamiento y de la rodilla que recibió tratamiento para cada rata se produjo utilizando un generador de números aleatorios en Microsoft Excel para Mac (versión 14.1.1). El proceso de aleatorización y asignación se llevó a cabo por personal que no había tenido contacto con los animales.

[0143] Para cada animal, se marcaron dos viales de polipropileno de 7 ml para designar la rodilla izquierda o la derecha (88 viales en total). Los 88 viales fueron preparados por dos personas (uno puntuaba y comprobaba la ficha de aleatorización maestra y uno dividía en alícuotas la solución para la inyección intraarticular). El proceso de división en alícuotas se llevó a cabo de manera secuencial, de modo que los viales MIA se llenaron primero y, a continuación, se llenaron los viales restantes con ETF-PBS (este era el vial de la rodilla contralateral para cada animal). Durante el transcurso del estudio *in vivo*, los científicos desconocían el estado de tratamiento de todos los animales.

Procedimientos con animales

Inyección intraarticular de la rodilla

[0144] Se anestesió a todas las ratas mediante inhalación de isoflurano utilizando un aparato de Boyle. Se recortaron los pelos de ambas rodillas de cada animal, y las rodillas se limpiaron con etanol. En cada rodilla, a través del ligamento infrapatelar, se inyectaron 50 µl de 0,3 mg de MIA en ETF-PBS, o bien únicamente ETF-PBS, utilizando una jeringa para insulina esterilizada de 0,5 ml Becton Dickinson Micro-Fine con una aguja acoplada de 27 G.

Evaluación del dolor espontáneo

[0145] Se determinó el dolor espontáneo para cada animal midiendo la capacidad para soportar peso de las extremidades posteriores izquierda y derecha empleando un medidor de incapacidad (Linton Instruments, Reino Unido). Las ratas se colocaron en una caja para animales de Perspex con un tamaño apropiado en el medidor de incapacidad, de tal manera que sus extremidades posteriores reposaban sobre sensores independientes. El tamaño de la caja permitía que la rata reposara cómodamente sin aplastarse, aunque, de igual modo, no permitía que la rata tuviera suficiente espacio como para girarse. Una vez que la rata estaba firme y tranquila, se registró la capacidad para soportar peso de cada extremidad durante 5 segundos, y se registró la fuerza media en gramos ejercida por ambas extremidades posteriores. Se determinó cinco veces la distribución del peso de las patas traseras (la validez que se ha demostrado anteriormente) para cada rata en cada momento, y se calculó la media de las cinco lecturas. Los datos individuales de capacidad para soportar peso se convirtieron en una distribución de peso dividiendo el peso de la extremidad derecha por el peso total de ambas extremidades posteriores.

Mediciones de dolor espontáneo tras la OA inducida por MIA

[0146] Se evaluó el dolor espontáneo utilizando un medidor de incapacidad para medir la distribución del peso a través de las extremidades traseras. Las evaluaciones se llevaron a cabo al inicio y 3 semanas después del tratamiento con MIA.

[0147] Los datos que se muestran en la **figura 6** representan la proporción del peso total en las extremidades traseras.

[0148] En el caso de los animales que no recibieron tratamiento, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la proporción de peso en las extremidades posteriores y las expectativas teóricas de 0,5.

[0149] En el caso de los animales tratados con anticuerpos de control, se soportó una cantidad de peso significativamente menor desde el punto de vista estadístico en la extremidad tratada que en la extremidad no tratada (39 % frente a 61 %). En los animales tratados con el anticuerpo anti-NGF (3 mg/kg de Tanezumab PG-007 biosimilar) y los tratados con p75NTR-Fc (SEQ ID N.º 3) con 0,3 y 1 mg/kg no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) entre la proporción de peso en la extremidad trasera tratada y las expectativas teóricas de 0,5 (distribución uniforme en ambas extremidades traseras) en cualquiera de los momentos medidos. El efecto analgésico de p75NTR-Fc (SEQ ID N.º 3) con 3 mg/kg fue todavía más significativo desde el punto de vista estadístico ($P < 0,05$) en comparación con los controles correspondientes.

[0150] A raíz de estos estudios, resulta evidente que p75NTR-Fc (SEQ ID N.º 3) es analgésica en el modelo de OA con MIA en ratas. Los efectos analgésicos de p75NTR-Fc (SEQ ID N.º 3) fueron superiores a los observados para los anticuerpos anti-NGF (PG-007: anticuerpo Tanezumab anti-NGF biosimilar de Pfizer) en dosis similares: 3 mg/kg, subcutánea.

Mejora inesperada de la afinidad de la molécula p75NTR-Fc de la secuencia 3 y de la secuencia 15 respecto a neurotrofinas individuales

[0151] A partir de la bibliografía y de la técnica anterior, se acepta generalmente que el receptor de neurotrofinas p75 de baja afinidad presenta una afinidad similar por todas las neurotrofinas de aproximadamente 1 nM (Ichim *et al.*, 2012 *Exp Cell Res* 318(11): 1221-8). Asimismo, la técnica anterior de Apollo Life Sciences (Molecules and chimeric molecules thereof, US 20090232808 A1) ejemplifica además la similitud de la afinidad del receptor de neurotrofinas p75 por las neurotrofinas individuales. «NGFR es una proteína de membrana de tipo I que se sintetiza como una glucoproteína de 427 aminoácidos que consta de un péptido señal de 28 aminoácidos. NGFR se une con una afinidad equivalente a todas las neurotrofinas».

[0152] A partir de estudios de resonancia de plasma de Biacore, se han mostrado cambios significativos en las afinidades de unión de las secuencias 3 y 15 acopladas a la Fc de la IgG1 humana utilizando un conector espaciador GGG.

Tabla 3: Afinidad de Biacore de la secuencia 3 y 15 por cada neurotrofina

Secuencia	NT-3 (pM)	NT-4 (pM)	BDNF (pM)	NGF (pM)
3	14	181	48	525
15	15	164	38	498

5 **Reducción del punto isoeléctrico (pI):**

[0153] En cuanto al punto isoeléctrico de la secuencia 3 y de las descritas en la técnica anterior de Apollo Life Science, estas presentan un pI teórico de 4,11; sin embargo, ambas de estas moléculas están considerablemente glicosiladas, lo cual deriva en que el pI se encuentre en realidad en el intervalo de 3-4.

10 **[0154]** La secuencia 15 posee un pI teórico de 4,23, y se encuentra menos glicosilada que otros p75NTR. Posteriormente, el pI está en el intervalo de 4-5. Este hecho ofrece una ventaja significativa (formulación mejorada y menor variabilidad en cuanto a la estructura molecular debido a la variación en los sitios de glicosilación y en la cantidad de glicosilación) en la secuencia 3 y en las secuencias descritas previamente en la técnica anterior de Apollo Life Science.

LISTA DE SECUENCIAS

15 **[0155]**

<110> Levicept Ltd.

<120> PROTEÍNA DE FUSIÓN

20 <130> LEV01134GBP1

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

25

<210> 1

<211> 460

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Proteína de fusión

<400> 1

ES 2 714 694 T3

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 Asp Gly Thr Tyr Ser Asp
 115 120 125
 Glu Ala Asn His Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp
 130 135 140
 Thr Glu Arg Gln Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys
 145 150 155 160
 Glu Glu Ile Pro Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly

ES 2 714 694 T3

165						170						175					
Ser	Asp	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Gln	Glu	Pro	Glu	Ala	Pro	Pro	Glu		
			180					185						190			
Gln	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Val	Ala	Gly	Val	Val	Thr	Thr	Val	Met		
		195					200							205			
Gly	Ser	Ser	Gln	Pro	Val	Val	Thr	Arg	Gly	Thr	Thr	Asp	Asn	Asp	Ile		
	210						215							220			
Glu	Gly	Arg	Met	Asp	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro		
	225				230						235				240		
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe		
				245					250					255			
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val		
				260				265						270			
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe		
		275					280							285			
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro		
	290						295				300						
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr		
	305				310					315					320		
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val		
				325					330					335			
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala		
			340					345						350			
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg		
		355					360							365			
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly		
	370						375				380						
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro		
	385				390					395					400		
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser		
				405					410					415			
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln		
			420					425						430			
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His		
		435						440						445			
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
	450						455				460						

ES 2 714 694 T3

<210> 2
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión

10

```

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1          5          10          15

Val His Ser Lys Glu Ala Cys Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly
          20          25          30

Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys
          35          40          45

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

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

Val Gly Leu Gln Ser Met Ser Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala
          85          90          95

Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg
          100          105          110

Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser
          115          120          125

Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr
          130          135          140

Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val
145          150          155          160

Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp
    
```

ES 2 714 694 T3

165 170 175

Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro
180 185 190

Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala
195 200 205

Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr
210 215 220

Thr Val Met Gly Gly Gly Gly Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

ES 2 714 694 T3

<210> 3
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión

10

```

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 Asp Gly Thr Tyr Ser Asp
 115         120         125

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

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

Glu Glu Ile Pro Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly
    
```


ES 2 714 694 T3

<210> 4
 <211> 1411
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Inserto de clonación

<400> 4

10

```

aagcttgccg ccaccatgga atggctcctgg gtgttcctgt tcttcctgtc cgtgaccacc      60
ggcgtgcact ccaaagaggc ttgtcccacc ggcctgtaca cccactctgg cgagtgttgc      120
aaggcctgta acctgggaga aggcgtggcc cagccttgtg gcgctaataca gacagtgtgc      180
gagccctgcc tggactccgt gaccttctcc gatgtggtgt ccgccaccga gccttgcaag      240
ccctgcacag agtgtgtggg cctgcagtcc atgtccgccc cttgctgtga agccgacgac      300
gccgtgtgta gatgocgcta cggctactac caggacgaga caaccggcag atgcgaggcc      360
tgacagagtgt gcgaagctgg ctctggcctg gtgttcagtt gtcaagacaa gcagaacacc      420
gtgtgcgagg aatgccccga cggcacctac tctgacgagg ccaatcacgt ggacccttgc      480
ctgccttgca ccgtgtgtga agataccgag cggcagctgc gcgagtgcac cagatgggct      540
gatgccgagt gcgaagagat ccctggcccg tggatcacca gatccacccc tccagagggc      600
tccgactcta ccgctccctc taccacaggaa cctgaggccc ctctgagca ggacctgatc      660
gcttctacag tggccggcgt cgtgaccaca gtgatgggcg gagggggcga gcctaagtcc      720
tccgacaaga cccacacctg tcccccttgt cctgcccctg aactgctggg cggaccttcc      780
gtgtttctgt tcccccaaaa gcccaaggac accctgatga tctcccggac ccccgaagtg      840
acctgcgtgg tgggtggatgt gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg      900
gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagta caactccacc      960
taccgggtgg tgtctgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagagtac     1020
aagtgcaagg tgtccaacaa ggccctgccg gcccocatcg aaaagaccat ctccaaggcc     1080
aagggccagc cccgggaacc ccagggtgtac aactgcccc ctagcagggg cgagctgacc     1140
aagaaccagg tgtccctgac ctgtctcgtg aagggttctt acccctccga tatcgcctgt     1200
gaatgggagt ccaacggcca gcctgagaac aactacaaga ccaccccccc tgtgctggac     1260
agcgcaggct cattctttct gtactccaag ctgacagtgg acaagtcccg gtggcagcag     1320
ggcaacgtgt tctcctgcag cgtgatgcac gaggtctctg acaaccacta caccagaag     1380

tccctgtccc tgagccccgg ctgatgaatt c                                     1411
    
```

15 <210> 5
 <211> 21

ES 2 714 694 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Sitio de la secretasa

<400> 5

Gly Ser Ser Gln Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Asp Ile
1 5 10 15

Glu Gly Arg Met Asp
20

10 <210> 6

<211> 51

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia parcial para alineamiento de secuencias.

<400> 6

Ile Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser
1 5 10 15

Gln Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr
20 25 30

Cys Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala
35 40 45

20 Phe Lys Arg
50

<210> 7

<211> 50

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial para alineamiento de secuencias

30 <400> 7

ES 2 714 694 T3

Ile Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ile Pro
 1 5 10 15

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 20 25 30

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 35 40 45

Leu Phe
 50

<210> 8

<211> 50

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial para alineamiento de secuencias

10

<400> 8

Ile Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ile Pro
 1 5 10 15

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 20 25 30

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 35 40 45

Leu Phe
 50

15 <210> 9

<211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia parcial para alineamiento de secuencias

<400> 9

ES 2 714 694 T3

Ile Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ile Pro
1 5 10 15

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
20 25 30

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
35 40 45

Leu Phe
50

<210> 10

<211> 45

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial para alineamiento de secuencias

10

<400> 10

Ile Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45

15 <210> 11

<211> 46

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia parcial para alineamiento de secuencias

<400> 11

ES 2 714 694 T3

Ile Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 20 25 30

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 35 40 45

<210> 12

<211> 51

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial para alineamiento de secuencias

10

<400> 12

Ile Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 20 25 30

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 35 40 45

Phe Leu Phe
 50

15

<210> 13

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia parcial para alineamiento de secuencias

<400> 13

25

ES 2 714 694 T3

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Val Phe Leu Phe
35

<210> 14

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Secuencia conectora

10

<400> 14

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala
1 5

15 <210> 15

<211> 410

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Proteína de fusión

<400> 15

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

25

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

ES 2 714 694 T3

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

ES 2 714 694 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 305 310 315 320

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 325 330 335

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 340 345 350

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 355 360 365

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 370 375 380

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 385 390 395 400

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 405 410

REIVINDICACIONES

- 1.** Proteína de fusión (NBP)-Fc de unión a neurotrofina p75NTR, comprendiendo:
- (a) una porción p75NTR(NBP); y
 - (b) una porción Fc de inmunoglobulina
- 5 donde las porciones p75NTR(NBP) y Fc están conectadas por medio de un conector comprendiendo un péptido de fórmula G_x , donde x es 1, 2, 3, 4, 5 o 6 y donde el conector no comprende ni consta de la secuencia GGGGS.
- 2.** Proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con la reivindicación 1, donde la p75NTR(NBP) es una p75NTR(NBP) humana.
- 10 **3.** Proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la Fc es una Fc humana.
- 4.** Proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, comprendiendo o constando de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 3.
- 15 **5.** Proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo o constando de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 15.
- 6.** Proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con cualquier reivindicación anterior donde la p75NTR(NBP) se une a cualquiera de NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 con una afinidad de unión (K_d) de entre aproximadamente 0,01 nM y aproximadamente 50 nM, medida mediante resonancia de plasmones superficiales a 20 °C.
- 20 **7.** Proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso en el tratamiento del dolor.
- 8.** Molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, opcionalmente comprendiendo, además, la codificación de una secuencia señal.
- 9.** Vector de expresión replicable para la transfección de una célula, opcionalmente una célula de mamífero, comprendiendo el vector la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 8.
- 25 **10.** Vector de expresión replicable según la reivindicación 9 donde el vector es un vector viral.
- 11.** Célula huésped que acoge la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 8.
- 12.** Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 o vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 para su uso en el tratamiento del dolor.
- 30 **13.** Proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la reivindicación 7 o ácido nucleico o vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc o la molécula de ácido nucleico o el vector se utiliza de forma separada, secuencial o simultánea en una combinación combinado con un segundo compuesto farmacológicamente activo.
- 14.** Composición farmacéutica, comprendiendo la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o según la reivindicación 7 o la molécula de ácido nucleico o el vector de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 12, y un portador y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 **15.** Kit comprendiendo:
- (a) la proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o según la reivindicación 7 o la molécula de ácido nucleico o el vector de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 12; y
 - (b) instrucciones para la administración de una cantidad efectiva de dicha proteína de fusión p75NTR(NBP)-Fc, molécula de ácido nucleico, vector o composición farmacéutica a un individuo para uno o más de la prevención o el tratamiento del dolor o para mejorar, controlar, reducir la incidencia o retrasar el desarrollo o la evolución del dolor.
- 40

KEACPTGLYTHSGECCACACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECV
GLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEEC
DGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDETERQLRECTRWADAEEIPGRWITRSTPPEGSDSTAPSTQ
EPEAPPEQDLIASTVAGVVTTVMGSSQPVVTRGTTDNDIEGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 1 – SEQ ID N.º 1

MEWSWVFLFVSVTTGVHSKEACPTGLYTHSGECCACACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDS
VTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYQDETTGRCEACRVCEAG
SGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDETERQLRECTRWADAEEIPG
RWITRSTPPEGSDSTAPSTQPEAPPEQDLIASTVAGVVTTVMGGGGEPKSSDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Figura 2 – SEQ ID N.º 2

KEACPTGLYTHSGECCACACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECV
GLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEEC
DGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDETERQLRECTRWADAEEIPGRWITRSTPPEGSDSTAPSTQ
EPEAPPEQDLIASTVAGVVTTVMGGGGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

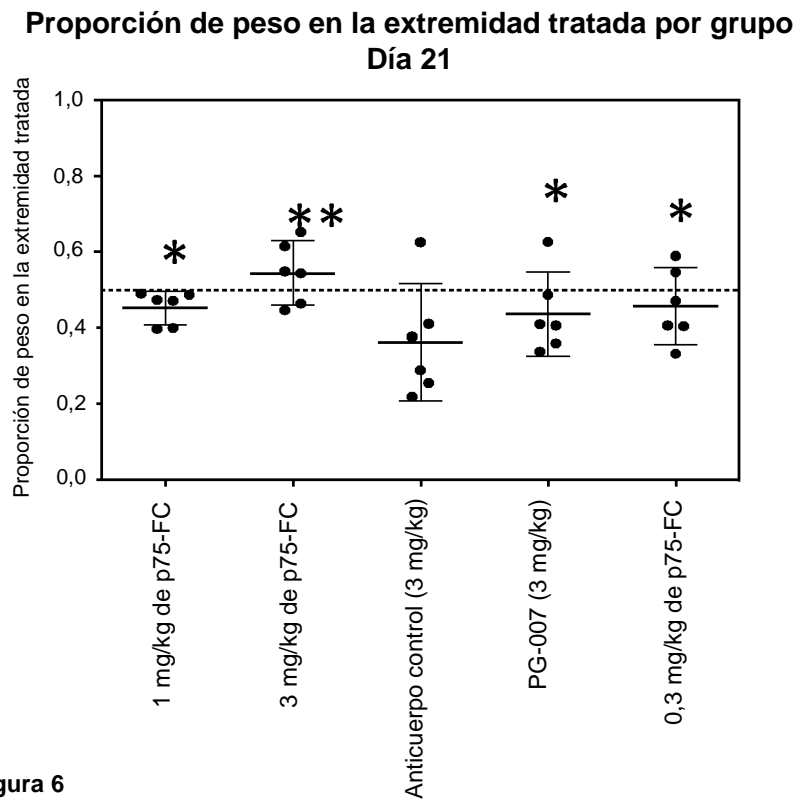
Figura 3 – SEQ ID N.º 3

AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGTCCTGGGTGTTCTTCCTGTCCGTGACCACC
GGCGTGC ACTCCAAAGAGGCTTGTCCCACCGGCCTGTACACCCACTCTGGCGAGTGTTGC
AAGGCCTGTAACCTGGGAGAAGGCGTGGCCCAGCCTTGTGGCGCTAATCAGACAGTGTG
CGAGCCCTGCCTGGACTCCGTGACCTTCTCCGATGTGGTGTCCGCCACCGAGCCTTGCAA
GCCCTGCACAGAGTGTGTGGGCCTGCAGTCCATGTCCGCCCTTTCGTGGAAGCCGACGA
CGCCGTGTGTAGATGCGCCTACGGCTACTACCAGGACGAGACAACCGGCAGATGCGAGG
CCTGCAGAGTGTGCGAAGCTGGCTCTGGCCTGGTGTTCAGTTGTCAAGACAAGCAGAAC
ACCGTGTGCGAGGAATGCCCCGACGGCACCTACTCTGACGAGGCCAATCACGTGGACCC
CTGCCTGCCTTGACCCGTGTGTGAAGATACCGAGCGGCAGCTGCGCGAGTGCACCAGAT
GGGCTGATGCCGAGTGCGAAGAGATCCCTGGCCGGTGGATCACCAGATCCACCCCTCCA
GAGGGCTCCGACTCTACCGCTCCCTCTACCCAGGAACCTGAGGCCCTCCTGAGCAGGAC
CTGATCGCTTCTACAGTGGCCGGCGTCGTGACCACAGTGTGGGCGGAGGCGGCGAGCC
TAAGTCTCCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCTGCCCTGAACTGCTGGGCGG
ACCTTCCGTGTTTCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCC
CGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATT
GGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTA
CAACTCCACTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCAACCAGGACTGGCTGAACGG
CAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCA
TCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCAGG
GACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCC
GATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACCACCCC
CCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTTCTGTA CTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTC
CCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACC
ACTACACCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCTGATGAATTC

Figura 4 – SEQ ID N.º 4

p75NTR	<u>I</u> ASTVAGVVTTVMGSSQPVVTRGTTDNLIPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKR (SEQ ID 6)
p75-Fc comercial	<u>I</u> ASTVAGVVTTVMGIPKVDKKV-EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 7)
p75-Fc	<u>I</u> ASTVAGVVTTVMGIPKVDKKV-EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 8)
p75-Fc C222S	<u>I</u> ASTVAGVVTTVMGIPKVDKKV-EPK <u>S</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 9)
p75-Fc G4x1	<u>I</u> ASTVAGVVTTVMG <u>GGG</u> -----EPK <u>S</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 10)
p75-Fc G4Sx1	<u>I</u> ASTVAGVVTTVMG <u>GGGS</u> -----EPK <u>S</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 11)
p75-Fc G4Sx2	<u>I</u> ASTVAGVVTTVMG <u>GGGS</u> GGGGSEPK <u>S</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 12)
IgGlza de Lonza	-----NTKVDKKV <u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF</u> (SEQ ID 13)

Figura 5 – SEQ ID N.^{os} 6 a 13



KEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEAD
DAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDETERQLR
ECTRWADAECEEIPGRWITRSTPPEGGGGEPKSSDKTHTCPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Figura 7 – SEQ ID N.º 15