

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 238**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 14/48 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2015 PCT/EP2015/052098**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15114150**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2015 E 15701985 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3099713**

54 Título: **Proteína quimérica compuesta por un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α**

30 Prioridad:

02.02.2014 US 201461934828 P

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

23.09.2020

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building, Granta Park, Cambridge
Cambridgeshire CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**SCHOFIELD, DARREN;
SLEEMAN, MATTHEW ALEXANDER;
CHESSELL, IAIN PATRICK;
HATCHER, JONATHAN y
LOWE, DAVID**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 784 238 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 quimérica compuesta por un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α

Antecedentes

El dolor es uno de los síntomas más comunes para los que se busca asistencia médica y es la queja principal de la mitad de todos los pacientes que visitan a un médico. A pesar de la existencia y el uso generalizado de numerosos medicamentos para el dolor, la eliminación del dolor, particularmente el dolor crónico, no ha tenido éxito. Por lo tanto, la carga sobre la sociedad sigue siendo alta. Varios estudios estiman que el dolor resulta en 50 millones de días de trabajo perdidos cada año y \$ 61,2 miles de millones en pérdida de productividad. Para quienes padecen dolor crónico, solo la mitad puede controlar el dolor con las opciones de tratamiento prescritas disponibles. Y, el mercado total de medicamentos recetados para el dolor es de aproximadamente \$ 25 mil millones por año. Como sugieren estos datos, sigue existiendo una gran necesidad de analgésicos novedosos seguros y efectivos.

Los agentes terapéuticos que reducen los niveles en tejidos o inhiben los efectos del factor de crecimiento nervioso secretado (NGF o beta-NGF) tienen el potencial de ser solo analgésicos novedosos. El NGF juega un papel fundamental bien conocido en el desarrollo del sistema nervioso; sin embargo, el NGF también es un objetivo bien validado para el dolor, ya que causa dolor en animales y humanos. En adultos, el NGF en particular, promueve la salud y la supervivencia de un subconjunto de neuronas centrales y periféricas (Huang y Reichardt, *Ann. Rev. Neurosci.* 24: 677-736 (2001)). El NGF también contribuye a la modulación de las características funcionales de estas neuronas y ejerce un control tónico sobre la sensibilidad o excitabilidad de los receptores del dolor sensorial llamados nociceptores (Priestley et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80: 495-505 (2002); Bennett, *Neuroscientist* 7: 13-17 (2001)). Los nociceptores perciben y transmiten al sistema nervioso central los diversos estímulos nocivos que dan lugar a la percepción del dolor (nocicepción). Los receptores del NGF se encuentran en los nociceptores. La expresión del NGF aumenta en el tejido lesionado e inflamado y se sobreexpresa en los estados de dolor en humanos. Por lo tanto, debido al papel del NGF en la nocicepción, los agentes de unión al NGF que reducen los niveles del NGF poseen utilidad como terapéutica analgésica.

Las inyecciones subcutáneas del NGF en sí mismas producen dolor en humanos y animales. El NGF inyectado causa una hiperalgesia térmica rápida, seguida de hiperalgesia térmica retardada y alodinia mecánica (Petty et al., *Ann. Neurol.* 36: 244-46 (1994); McArthur et al., *Neurology* 54: 1080-88 (2000)). El NGF secretado de manera endógena es similarmente pronociceptivo. La liberación del NGF inducida por lesión tisular y su acción posterior en la periferia desempeña un papel importante en la inducción de hiperalgesia térmica a través del proceso de "sensibilización periférica" (Mendell y Arvanian, *Brain Res. Rev.* 40: 230-39 (2002)). La lesión del tejido promueve la liberación de citocinas pronociceptivas y proinflamatorias, que, a su vez, inducen la liberación del NGF de los queratinocitos y fibroblastos. Este NGF liberado actúa directamente sobre los nociceptores para inducir estados dolorosos o nociceptivos a los pocos minutos del ataque nocivo. Por lo tanto, el NGF también actúa indirectamente para inducir y mantener estados nociceptivos/dolorosos en una liberación de avance. Desencadena la desgranulación de los mastocitos, liberando agentes pronociceptivos como la histamina y la serotonina y, lo que es más importante, más NGF, y también puede estimular las terminales nerviosas simpáticas para liberar neurotransmisores pronociceptivos, como la noradrenalina (Ma & Woolf, *Neuroreport.* 8: 807-10 (1997)).

Los niveles en tejido del NGF están elevados en animales inyectados con adyuvante completo de Freund (CFA) y carragenano (Ma & Woolf, *Neuroreport.* 8: 807-10 (1997); Amann y Schuligoi, *Neurosci. Lett.* 278: 173-78 (2000)). El NGF potencia la respuesta de capsaicina en DRG (ganglios de la raíz dorsal) en la rata. Se han documentado niveles elevados del NGF en pacientes que sufren de artritis reumatoide (Aloe y Tuveri, *Clin. Exp. Rheumatol.* 15: 433-38 (1997)) o cistitis (Lowe et al., *Br. J. Urol.* 79: 572-77 (1997)). En roedores, la lesión nerviosa periférica aumenta la expresión de ARNm del NGF en macrófagos, fibroblastos y células de Schwann (Heumann et al., *J. Cell Biol.* 104: 1623-31 (1987)). La sobreexpresión del NGF en ratones transgénicos produce un comportamiento de dolor neuropático aumentado después de una lesión nerviosa por encima de la de los ratones de tipo silvestre (Ramer et al., *Pain, Supp.* 6: S111-20 (1998)). Durante horas y 15 días, los niveles elevados del NGF juegan un papel en la promoción de la "sensibilización central", el aumento de la neurotransmisión en las sinapsis en las vías nociceptivas de la médula espinal. La sensibilización central produce hiperalgesia y alodinia persistentes y crónicas. Se cree que este proceso implica la internalización de complejos del NGF y su receptor de alta afinidad, el receptor de tirosina quinasa A (trkA). El transporte retrógrado de estos complejos a los cuerpos celulares nociceptivos en los DRG potencia la secreción de neuropéptidos nociceptivos, por ejemplo, la sustancia P, o el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la activación de la proteína quinasa C (PKC) y la activación del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) en el asta dorsal de la médula espinal (Sah et al., *Nat. Rev. Drug Disc.* 2: 460-72 (2003)) - todos los procesos que promueven la sensibilización de las vías nociceptivas. El NGF también juega un papel en la sobreexpresión y la redistribución de los canales iónicos dependientes de voltaje y de entrada de ligandos, incluidos los subtipos de canales de sodio y el receptor de capsaicina, el miembro 1 de la subfamilia V del canal catiónico receptor de potencial transitorio (TRPV1) (Mamet et al., *J. Biol. Chem.* 278: 48907-13 (1999); Fjell et al., *J. Neurosci. Res.* 57: 39-47 (1999); Priestley et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80: 495-505 (2002)). Las actividades alteradas y/o la expresión de transmisores, receptores y canales iónicos subyacen al aumento de la sensibilidad y la excitabilidad de los nociceptores asociados con los estados de dolor neuropático.

La nocicepción/dolor inducido por el NGF está mediada por el receptor del NGF de alta afinidad, trkA (receptor de tirosina quinasa A) (Sah, et al., Nat. Rev. Drug Disc. 2: 460-72 (2003)). Alrededor del 40-45% de los cuerpos celulares nociceptores en los DRG expresan trkA. Estos son los cuerpos celulares de las fibras de diámetro pequeño, o fibras C, que también expresan los péptidos pronociceptivos secretados, la sustancia P y CGRP. Estas fibras terminan en las láminas I y II del asta dorsal, donde transfieren al sistema nervioso central los estímulos nocivos detectados por los nociceptores periféricos. Las mutaciones o eliminaciones en el gen trkA producen un fenotipo caracterizado por la pérdida de la sensación de dolor tanto en humanos (Indo, Clin. Auton. Res. 12 (Supp 1): I20-I32 (2002)) como en ratones con trkA inactivado (de Castro et al., Eur. J. Neurosci. 10: 146-52 (1998)). Significativamente, la expresión de trkA está sobrerregulada en animales sometidos a modelos de artritis (Pozza et al., J. Rheumatol. 27: 1121-27 (2000)) o dolor cistítico (Qiao y Vizzard, J. Comp. Neurol. 454: 200-11 (2002)), o el dolor inflamatorio inducido por inyección de CFA o carragenano en la pata (Cho et al., Brain Res. 716: 197-201 (1996)).

El NGF también se une al receptor de neurotrofina p75 (p75NTR). El papel de p75NTR depende de su entorno celular y de la presencia de otros receptores con los que se cree que desempeña una función accesoria o correceptora. La interacción entre trkA y p75NTR da como resultado la formación de sitios de unión de alta afinidad para el NGF. La importancia de tales interacciones del receptor en la señalización del dolor mediada por NGF no está clara, pero estudios recientes han implicado al p75NTR en procesos celulares que pueden ser relevantes (Zhang y Nicol, Neurosci. Lett. 366: 187-92 (2004)). Sin embargo, aunque que los ratones con inactivación de p75NTR muestran umbrales elevados para estímulos nocivos, siguen respondiendo a los efectos hiperalgésicos del NGF, lo que sugiere que los receptores de trkA solos son suficientes para mediar estos efectos (Bergmann et al., Neurosci. Lett. 255: 87-90 (1998)).

El bloqueo del NGF produce eficacia de cambio escalonado frente al NSAID en el dolor nociceptivo crónico, por ejemplo, en la osteoartritis (OA) y en el dolor crónico de la espalda baja. Varios candidatos de anticuerpos terapéuticos dirigidos al NGF se encuentran en diversas etapas de desarrollo preclínico y clínico. Tales anticuerpos incluyen, por ejemplo, Tanezumab (PF-4383119; Pfizer), que es un anticuerpo humanizado en un formato de IgG2; SAR164877/REGN475 (Sanofi-Aventis/Regeneron Pharmaceuticals), que es un anticuerpo humano en formato de IgG4; AMG 403 (Amgen/Johnson & Johnson), que es un anticuerpo humano en formato de IgG2; PG110 (PanGenetics/Abbott), que es un anticuerpo humanizado en un formato de IgG4. Otro candidato de anticuerpo terapéutico se divulga en el documento WO 2006/077441, que se refiere a anticuerpos del NGF y a métodos de tratamiento de enfermedades o trastornos en los que el NGF juega un papel con los anticuerpos descritos. MEDI-578 es un anticuerpo humano en formato de IgG4. A pesar del desarrollo de estos candidatos, sigue existiendo la necesidad de proporcionar alivio analgésico para una gama más amplia de condiciones de dolor a través de un agente de unión al NGF que tiene una eficacia robusta y mejores perfiles de seguridad.

El factor alfa de necrosis tumoral (TNF α), también llamado caquectina, es una citocina pleiotrópica con una amplia gama de actividades biológicas que incluyen citotoxicidad, proliferación de células inmunes, inflamación, tumorigénesis y replicación viral. Kim et al., J. Mol. Biol. 374, 1374 (2007). El TNF α se produce primero como una proteína transmembrana (TNF α tm), que luego es escindido por una metaloproteinasa en una forma soluble (TNF α s). Wallis, Lancet Infect. Dis. 8 (10): 601 (2008). TNF α (~17 kDa) existe como una molécula homotrimérica rígida, que se une al Receptor 1 del TNF o al Receptor 2 de TNF de la superficie celular, induciendo la oligomerización del receptor y la transducción de señales.

Se sabe que las citocinas inflamatorias, y en particular TNF α , tienen un papel en la generación de hiperalgesia. Leung, L. y Cahill, CM., J. Neuroinflammation 7:27 (2010). Algunos datos preliminares han demostrado que los inhibidores de TNF α pueden ser útiles en el control del dolor neuropático. Véase, por ejemplo, Sommer C, et al., J. Peripher. Nerv. Syst. 6: 67-72 (2001), Cohen et al, A&A Feb 2013, 116, 2, 455-462, Genevay et al., Ann Rheum Dis 2004, 63, 1120-1123. Los resultados de estudios clínicos que prueban inhibidores de TNF α como una terapia única en el tratamiento del dolor neuropático no es concluyente. Véase Leung y Cahill (2010).

A pesar del desarrollo de candidatos dirigidos a NGF y TNF α para el tratamiento del dolor, sigue siendo necesario proporcionar alivio analgésico para diversas condiciones de dolor a través de agentes que tienen una eficacia mejor que el estándar de atención actual. Esta divulgación proporciona tratamientos combinados dirigidos tanto al NGF como al TNF α , que pueden aumentar la eficacia y tienen el potencial de disminuir tanto la cantidad como la frecuencia de administración para quienes padecen dolor.

El documento WO 2010/006060 se refiere a proteínas de dominio variable dual que pueden unirse a dos o más de una variedad de antígenos posibles, tales como NGF o TNF α . El documento US 2011/250130 se refiere al uso de anticuerpos que se unen al TNF α y que pueden administrarse en combinación con un anticuerpo que se une a una serie de otros objetivos, como el NGF. El documento WO 2007/146968 se refiere a anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla que comprenden un primer y segundo dominio de unión que reconocen objetivos tales como TNF α y NGF. El documento WO 2011/047262 se refiere a anticuerpos o fragmentos biespecíficos diseñados contra NGF y TNF α .

Breve resumen de la divulgación

La invención se divulga mediante las reivindicaciones adjuntas. Como se divulga en la reivindicación 1, se proporciona una molécula de unión que comprende un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α , en el que el dominio antagonista del NGF es un fragmento scFv anti-NGF, y el dominio antagonista del TNF α comprende un fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α ; en el que el dominio antagonista del TNF α comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a los aminoácidos 1 a 235 de la SEQ ID NO: 13; en el que el fragmento scFv anti-NGF comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94 y un dominio VL de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95, en la que el fragmento scFv anti-NGF es estabilizado por SS. También se proporciona un polinucleótido aislado como se divulga en la reivindicación 15, y un vector como se divulga en la reivindicación 16. Además se proporciona una célula huésped como se divulga en la reivindicación 17, y una composición que comprende la molécula de unión como se divulga en la reivindicación 18. Otras características ventajosas se divulgan en las restantes reivindicaciones dependientes.

Esta descripción proporciona composiciones para usar en el control del dolor en un sujeto, que comprenden una cantidad eficaz de un antagonista del factor de crecimiento nervioso (NGF) y un antagonista del factor alfa de necrosis tumoral (TNF α), o una molécula de unión que comprende un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α , para la administración a un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones, la administración controla el dolor en el sujeto más efectivamente que una cantidad equivalente del antagonista del NGF o el antagonista del TNF α administrados solos. En algunas realizaciones, la composición comprende un antagonista del TNF α para la coadministración con un antagonista del NGF. En algunas realizaciones, la composición comprende un antagonista del NGF para la coadministración con un antagonista del TNF α . En algunas realizaciones, el antagonista del TNF α y el antagonista del NGF se administran secuencialmente o simultáneamente.

En algunas realizaciones, la composición para uso es suficiente para prevenir, reducir, mejorar o eliminar el dolor en el sujeto. En algunas realizaciones, el dolor es dolor agudo, dolor de corto plazo, dolor nociceptivo persistente o crónico, o dolor neuropático persistente o crónico. En algunas realizaciones, la composición para uso es al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 80%, 90% o 100% más efectiva para controlar el dolor en el sujeto que una cantidad equivalente del antagonista del NGF o el antagonista del TNF α administrados solos.

En algunas realizaciones, la porción antagonista del TNF α de la molécula de unión se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el antagonista del NGF se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1

En algunas realizaciones, la porción antagonista del NGF de la molécula de unión es un anticuerpo anti-NGF, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede inhibir la unión del NGF a TrkA, p75NTR, o ambos TrkA y p75NTR. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF bloquea preferentemente la unión del NGF a TrkA sobre la unión del NGF a p75NTR. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo se une al NGF humano con una afinidad de aproximadamente 0,25-0,44 nM. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo se une al mismo epítipo que MEDI-578. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo inhibe competitivamente la unión de MEDI-578 al NGF humano.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende un conjunto de CDR HCDR1, HCDR2, HCDR3 y un dominio VL de anticuerpo que comprende un conjunto de CDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en la que la HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 4 con hasta dos sustituciones de aminoácidos, la HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 5 con hasta dos sustituciones de aminoácidos, la HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 6 con hasta dos sustituciones de aminoácidos, SSRIYDFNSALISYYDMDV (SEQ ID NO: 11) o SSRIYDMISLQPYDMDV (SEQ ID NO: 12), la LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 8 con hasta dos sustituciones de aminoácidos, la LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 9 con hasta dos sustituciones de aminoácidos, y la LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 10 con hasta dos sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo es un anticuerpo completamente H₂L₂, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab)₂ o un fragmento Fv de cadena única (scFv). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo es humanizado, quimérico, primatizado o completamente humano. En algunas realizaciones, el antagonista del NGF es un fragmento scFv anti-NGF. En algunas realizaciones, el scFv está estabilizado por SS. En algunas realizaciones, el fragmento scFv anti-NGF comprende, desde el extremo terminal N al extremo terminal C, un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, una secuencia enlazadora de 15 aminoácidos (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 15), y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, el fragmento scFv anti-NGF comprende, desde el extremo terminal N hasta el terminal C, un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94, una secuencia enlazadora de 20 aminoácidos (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19) y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95.

En algunos aspectos, la composición para uso comprende un antagonista del TNFα que inhibe la unión del TNFα a un receptor del TNF (TNFR), bloqueando así la actividad del TNFα. En algunas realizaciones, el antagonista del TNFα comprende un anticuerpo anti-TNFα, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TNFα o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende un conjunto de CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y un dominio VL de anticuerpo que comprende un conjunto de CDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que las CDR son idénticas a las HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de infliximab o las HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de adalimumab.

En algunas realizaciones, la molécula de unión comprende un anticuerpo anti-TNFα completo y un scFv anti-NGF fusionado al extremo terminal C de la cadena pesada del anticuerpo anti-TNFα. Esa molécula de unión puede comprender una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

En algunas realizaciones, el antagonista del TNFα comprende un fragmento de una TNFR soluble de unión a TNFα. En algunas realizaciones, la TNFR es TNFR-2 o un fragmento soluble de la misma. En otras realizaciones, la TNFR es TNFR-1 o un fragmento soluble de la misma. En algunas realizaciones, el fragmento soluble de TNFR-1 es un fragmento de 55 kD. En otras realizaciones, el fragmento soluble del fragmento de TNFR-2 es un fragmento de 75 kD. En algunas realizaciones, el fragmento de TNFR se fusiona a un dominio Fc de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, el antagonista del TNFα tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 13, o un fragmento funcional de la misma.

En algunas realizaciones, la molécula de unión comprende una proteína de fusión que comprende al antagonista del NGF fusionado al antagonista del TNFα a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la molécula de unión es un homodímero de la proteína de fusión.

En algunas realizaciones, el antagonista del NGF es un dominio scFv anti-NGF y el antagonista del TNFα es un fragmento soluble, que se une a TNFα del TNFR-2 fusionado en su extremo terminal carboxilo a un dominio Fc de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el scFv se fusiona al extremo terminal carboxilo del dominio Fc de inmunoglobulina a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, la molécula de unión comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende, desde el extremo terminal N hasta el extremo terminal C, un fragmento de TNFR-2 de 75kD de unión a TNFα, un dominio IgG1Fc humano, un enlazador de 10 aminoácidos (GGGGS)₂, un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO 3, una secuencia enlazadora de 15 aminoácidos (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 15) y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la molécula de unión comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, la molécula de unión comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En algunas realizaciones, la molécula de unión comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende, desde el extremo terminal N hasta el extremo terminal C, un fragmento de TNFR-2 de 75 kD de unión a TNFα, un dominio IgG1Fc humano, un enlazador de 10 aminoácidos (GGGGS)₂, un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94, una secuencia enlazadora de 20 aminoácidos (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19) y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95. En algunas realizaciones, la molécula de unión comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la molécula de unión comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

En algunas realizaciones, la molécula de unión comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende, desde el extremo terminal N hasta el extremo terminal C, un fragmento de TNFR-2 de 75 kD de unión a TNFα, un dominio IgG1Fc humano, una secuencia enlazadora y un dominio scFv anti-NGF.

La divulgación también proporciona composiciones para inhibir la fosforilación de p38 en una célula, en la que la composición pone en contacto una célula con cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento (por ejemplo, cualquiera de las moléculas de unión que comprenden un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α descritos en el presente documento). La divulgación también proporciona composiciones para inhibir la fosforilación de ERK en una célula, en la que la composición pone en contacto una célula con cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento (por ejemplo, cualquiera de las moléculas de unión que comprenden un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α descritos en el presente documento). En algunas realizaciones, la célula es una célula neuronal. En otras realizaciones, la célula es una célula neuronal periférica. En otras realizaciones más, la célula es una célula neuronal central. En algunas realizaciones, la célula está en un mamífero. En algunas realizaciones, el mamífero es un humano. En algunas realizaciones, la célula está en un cultivo de células.

La divulgación también proporciona secuencias de polinucleótidos que codifican las moléculas de unión divulgadas en el presente documento, los vectores que comprenden esas secuencias de polinucleótidos y las células huésped que comprenden esos polinucleótidos o vectores.

La divulgación también proporciona métodos para producir las moléculas de unión descritas en este documento.

La divulgación también proporciona composiciones, composiciones farmacéuticas y kits que comprenden las moléculas de unión descritas en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos/figuras

Figura 1: Representación esquemática de una proteína de fusión TNFR2-Fc (Panel A), y un ejemplo de una molécula de unión multiespecífica, TNFR2-Fc_VH#4, que comprende un dominio TNFR2-Fc fusionado a un dominio scFv anti-NGF (panel B).

La Figura 2A muestra los resultados del análisis SEC-HPLC de los niveles de fragmentación de agregados, monómeros y proteínas en un lote de TNFR2-Fc_VH#4 purificada.

La Figura 2B muestra el análisis SDS-PAGE de TNFR2-Fc_VH#4 purificada y la proteína TNFR2-Fc purificada en condiciones reducidas y no reducidas. Orden de carga del gel: 1. TNFR2-Fc_VH#4, 2. TNFR2-Fc_VL-VH (TNFR2-Fc fusionada a un scFv anti-NGF con orientación del gen de dominio variable inverso), 3. scFv 1 irrelevante para TNFR2-Fc, 4. TNFR2-Fc, 5. scFv 2 irrelevante para TNFR2-Fc.

La Figura 3A muestra la pureza de TNFR2-Fc_VH#4 después de la purificación en columna de proteína A. La Figura 3B muestra la pureza de TNFR2-Fc_VH#4 después de una segunda etapa de purificación en una columna de Sepharose SP.

La Figura 4 muestra un análisis de estabilidad de TNFR2-Fc_VH#4 usando calorimetría diferencial de barrido.

La Figura 5 muestra la unión de TNFR2-Fc_VH#4 a TNF α y NGF, tanto solos como juntos, de acuerdo con lo determinado por ELISA. La Figura 5A muestra la unión a NGF, la Figura 5B muestra la unión a TNF α y la Figura 5C muestra la unión simultánea a TNF α y NGF.

La Figura 6 muestra un diagrama de detección de un ensayo de unión de resonancia de plasmón superficial para TNFR2-Fc_VH#4. La unión concurrente al antígeno del anticuerpo multiespecífico TNFR2-Fc_VH#4 se realizó utilizando BIAcore 2000. La unión simultánea al antígeno se evaluó uniéndolo en serie TNF α y NGF sobre TNFR2-Fc_VH#4 unida a la superficie del sensor. La primera parte del diagrama de detección muestra la unión de cantidades saturantes de TNF α al anticuerpo multiespecífico, la segunda parte del diagrama de detección muestra la unión cuando se aplicó un segundo antígeno, ya sea TNF α nuevamente, que mostró que la superficie estaba saturada, o una mezcla equimolar de TNF α y NGF. Un aumento en las unidades de resonancia equivale a la unión del NGF a la molécula multiespecífica y, por lo tanto, la unión simultánea al antígeno. El ensayo también se realizó con la adición de antígeno en el orden inverso confirmando estos datos.

La Figura 7 muestra la inhibición de la proliferación mediada por NGF de células TF-1. A. Proliferación mediada por NGF en ausencia de antagonista del NGF añadido. B. Inhibición de la respuesta del NGF humano por TNFR2-Fc_VH#4. C. Inhibición de la respuesta del NGF murino por TNFR2-Fc_VH#4. La actividad del NGF se representa normalmente como RLU unidad de luminiscencia relativa, y el % de proliferación mediada por NGF se calcula como el % de respuesta al ligando de NGF solo usando la siguiente fórmula: $100 \times (\text{RLU del pozo} - \text{RLU de fondo}) / (\text{RLU total} - \text{RLU de fondo})$, en la que RLU de fondo = promedio de los controles de medios, y RLU total = promedio de los controles de ligando solamente. D. Inhibición de la respuesta de NGF humano por TNFR2-Fc_VarB y ndimab VarB. E. Inhibición de la respuesta de NGF murino por TNFR2-Fc_VarB y ndimab VarB.

La Figura 8 muestra la inhibición de la actividad de la Caspasa 3 inducida por TNF α en células U937. A. Actividad de Caspasa 3 inducida por TNF α en células U937 en ausencia de antagonista del TNF α añadido. B. Inhibición de actividad de Caspasa 3 inducida por TNF α en células U937 se muestra como porcentaje de respuesta en ausencia de antagonista agregado. La actividad del TNF se representa normalmente como unidad de fluorescencia relativa, RFU,

y el % de liberación de caspasa 3 mediada por TNF se calculó como el % de respuesta al ligando de TNF solo usando la fórmula como se describió anteriormente en la Figura 7C. C. Se muestran resultados similares para una molécula relacionada TNFR2-Fc_varB y ndimab VarB.

5 La Figura 9 muestra el efecto del tratamiento combinado con etanercept y MEDI-578 en una hiperalgesia mecánica inducida por ligadura parcial del nervio ciático. Los resultados se muestran como la relación ipsilateral/contralateral. N = 9-10 por grupo. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de 2 vías con tiempo y tratamiento como factores dependientes. La significancia estadística posterior se obtuvo mediante la prueba Post Hoc de Bonferroni. *** p <0,001 para Op + control de CAT-251.

10 La Figura 10A muestra el efecto de TNFR2-Fc_VH#4 sobre la hiperalgesia mecánica inducida por ligadura parcial del nervio ciático. Los resultados se muestran como la relación ipsilateral/contralateral. N = 10 por grupo. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de 2 vías con tiempo y tratamiento como factores dependientes. La significancia estadística posterior se obtuvo mediante la prueba Post Hoc de Bonferroni. *** p <0,001 frente al control de isotipo biespecífico. La Figura 10B muestra resultados similares con una molécula relacionada TNFR2-Fc_varB.

15 La Figura 11 muestra el efecto de la coadministración de MEDI-578 y etanercept sobre la reducción del dolor en un modelo de dolor articular de hipersensibilidad mecánica. N = 9-10 por grupo. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de 2 vías. La significancia estadística posterior se obtuvo mediante la prueba Post Hoc de Bonferroni. * P > 0,05; *** P <0,001 frente a CAT-251.

20 La Figura 12 muestra el efecto de TNFR2-Fc_VH#4 sobre la reducción del dolor en un modelo de dolor articular de hipersensibilidad mecánica. N = 9-10 por grupo. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de 2 vías. La significancia estadística posterior se obtuvo mediante la prueba Post Hoc de Bonferroni. *** P <0,001 frente al control de isotipo biespecífico.

La Figura 13 muestra los efectos de cinco dosis diferentes de TNFR2-Fc_varB sobre la hiperalgesia inducida por CFA en un modelo de rata.

Figura 14: Un mapa de calor que muestra las relaciones de HTRF de las reacciones de fosfo-p38.

25 Figura 15: Curvas de respuesta a la dosis que muestran el efecto de TNF α , NGF o una combinación de TNF α y NGF sobre la fosforilación de p38.

Figura 16: Un mapa de calor que muestra las relaciones HTRF de las reacciones fosfo-ERK.

Figura 17: Curvas de respuesta a la dosis que muestran el efecto de TNF α , NGF o una combinación de TNF α y NGF sobre la fosforilación de ERK.

30 Descripción detallada

Definiciones

Debe observarse que el término "un" o "uno, una" entidad se refiere a una o más de esa entidad. Como tal, los términos "un" (o "uno, una"), "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

35 Además, "y/o" cuando se usa en el presente documento debe tomarse como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por lo tanto, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A y/o B" en el presente documento pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Del mismo modo, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A, B y/o C" pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

40 Se entiende que siempre que se describan aspectos en el presente documento con la expresión "que comprende", también se proporcionan aspectos análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

45 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia al que se refiere esta divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2ª ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3ª ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, revisado, 2000, Oxford University Press, le proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta divulgación.

50 Las unidades, prefijos y símbolos se denotan en su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxilo. Los títulos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos de la divulgación, que se pueden obtener haciendo referencia a la especificación en su conjunto. Por consiguiente, los términos definidos a continuación se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Como se usa en este documento, el término "molécula de unión" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico, por ejemplo, un antígeno. Los ejemplos no limitantes de una molécula de unión incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos, proteínas de fusión del receptor soluble o fragmentos de los mismos, armazones que no son de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos, cada uno de los cuales retiene la unión específica a antígeno. Los ejemplos de armazones que no son de inmunoglobulina incluyen Tn3 (Koide et al., J Mol Biol., 13 de enero de 2012; 415 (2): 393-405), DARPin (Boersma & Pluckthun, Curr Opin Biotechnol. 2011 22 (6): 849-57), anticalina (Gebauer y Skerra, Methods Enzymol. 2012; 503: 157-88). A continuación se proporcionan ejemplos de proteínas de fusión de receptores solubles y anticuerpos. En ciertas realizaciones, la molécula de unión podría manipularse para que comprenda combinaciones de tales anticuerpos o fragmentos de los mismos, proteínas de fusión del receptor soluble o fragmentos de las mismas, y armazones o fragmentos de los mismos no basados en inmunoglobulinas.

La molécula de unión, o cualquier porción de la molécula de unión que reconoce un antígeno se denomina en el presente documento un "dominio de unión". A menos que se refiera específicamente a moléculas de unión de tamaño completo, tal como los anticuerpos naturales, el término "molécula de unión" abarca, sin limitación, anticuerpos de tamaño completo u otras moléculas de unión no a anticuerpo, así como fragmentos de unión a antígeno, variantes, análogos, o derivados de tales moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos naturales o moléculas de inmunoglobulina o moléculas de unión manipuladas o fragmentos que se unen al antígeno de una manera similar a la molécula de unión de tamaño completo.

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona ciertas moléculas de unión multiespecíficas, por ejemplo, moléculas de unión biespecíficas, trispecíficas, tetraespecíficas, etc., o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de las mismas. Como se usa en el presente documento, una molécula de unión multiespecífica puede incluir uno o más dominios de unión a anticuerpos, uno o más dominios de unión no a anticuerpos, o una combinación de los mismos.

El término "factor de crecimiento nervioso" ("NGF") también se conoce en la literatura como factor de crecimiento nervioso beta, como se usa en este documento se refiere a una proteína secretada que funciona en el crecimiento y la supervivencia de varias neuronas. El NGF humano se presenta como el número de acceso de GenBank NP_002497.2, y se presenta en el presente como la SEQ ID NO: 1. El término NGF como se usa en este documento no se limita al NGF humano, e incluye todas las especies ortólogas del NGF humano. El término "NGF" abarca la proforma del NGF, pro-NGF, NGF de longitud completa, así como cualquier forma del NGF que resulte del procesamiento dentro de la célula. El término también abarca variantes naturales del NGF, por ejemplo, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas. El NGF puede unirse a dos receptores: el receptor de neurotrofina p75 (p75 (NTR)) y TrkA, una tirosina quinasa transmembrana. El NGF es un objetivo bien validado para el dolor que se sabe que media la sensibilización de los nociceptores.

Se está probando una variedad de agentes como antagonistas de la actividad del NGF. Uno de esos agentes anti-NGF es trkA-Fc, que actúa como señuelo o eliminador para unirse y, por lo tanto, inactivar, NGF endógeno. TrkA-Fc es una proteína de fusión que consiste en la región de unión a NGF de trkA unida a un fragmento de dominio constante (Fc) de un anticuerpo IgG. TrkA-Fc produce hipoalgesia en animales no modificados, disminuye las respuestas de los nociceptores y disminuye el brote de neuronas no sensibles al dolor (Bennett, D. L. et al., (1998) Eur J Neurosci, 10: 1282-91).

El dolor mediado por NGF es particularmente adecuado para un tratamiento seguro y efectivo con moléculas de unión como se establece en el presente documento porque los niveles del NGF aumentan en la periferia en respuesta a estímulos nocivos y los anticuerpos tienen baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica. En la literatura se pueden encontrar varios anticuerpos anti-NGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que pueden usarse en las terapias y composiciones descritas en el presente documento, véase, por ejemplo, las publicaciones PCT Nos. WO02/096458 y WO04/032870.

El término "MEDI-578" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a NGF, que es el objetivo de la solicitud internacional No. PCT/GB2006/000238 y la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2008/0107658 A1. Las secuencias de cadena pesada y ligera de MEDI-578 se muestran en las SEQ ID NOs: 3 y 7, respectivamente.

El término NGF-NG se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a NGF. Las secuencias de cadena pesada y ligera del NGF-NG se muestran en las SEQ ID NOs: 24 y 26, respectivamente.

El término "factor alfa de necrosis tumoral" ("TNF α "), también denominado en la literatura como caquectina, proteína APC1; factor de necrosis tumoral; TNF; o el miembro 2 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral, como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína TNF α específica, y no a la superfamilia de ligandos de TNF. El TNF α humano se presenta como el número de acceso de GenBank NP_000585.2, y se presenta como la SEQ ID NO: 2. El término TNF α como se usa en el presente documento no se limita al TNF humano, e incluye todas las especies ortólogas de TNF α humano. El término "TNF α " abarca la proforma de TNF α , pro-TNF α , TNF α de longitud completa, así como cualquier forma de TNF α que resulte del procesamiento dentro de la célula. El término también abarca variantes de TNF α de origen natural y no natural, por ejemplo, variantes de empalme, variantes alélicas e

isoformas. TNF α puede unirse a dos receptores, TNFR1 (receptor de TNF tipo 1; CD120a; p55/60) y TNFR2 (receptor de TNF tipo 2; CD120b; p75/80). TNF α funciona como una citocina proinflamatoria, por ejemplo, que funciona en neuroinflamación. Por ejemplo, se cree que TNF α está involucrado funcionalmente en la generación de dolor neuropático (Leung, L. y Cahill, CM., J. Neuroinflammation 7:27 (2010)).

5 Se conocen en la técnica una gran cantidad de antagonistas del TNF α , y muchos están disponibles comercialmente como agentes terapéuticos. Los ejemplos de antagonistas de TNF-alfa disponibles comercialmente que se pueden usar en las terapias y composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen etanercept (ENBREL®, Amgen/Pfizer), infliximab (por ejemplo, REMICADE®, Centocor), certolizumab pegol (por ejemplo, CIMZIA®, UCB), golimumab (por ejemplo, SIMPONI^{MR}, Centocor) y adalimumab (por ejemplo, HUMIRA®/TRUDEXA®, Abbott).

10 Una molécula de unión, polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped o composición "aislada" se refiere a una molécula, polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped o composición de unión que está en una forma no natural. Las moléculas de unión, polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células huésped o composiciones aisladas incluyen aquellas que han sido cambiadas, adaptadas, combinadas, reorganizadas, modificadas o bien manipuladas hasta el punto de que ya no están en la forma en que se encuentran en la naturaleza.

15 En algunos aspectos, una molécula de unión, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped o composición que se aísla es "recombinante".

Como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido multifuncional" y "polipéptido bifuncional" se refieren a una molécula de unión no natural diseñada para atacar dos o más antígenos. Un polipéptido multifuncional como se describe en el presente documento es típicamente una proteína de fusión manipulada genéticamente diseñada para

20 unir dos funciones biológicas deseadas diferentes en una sola molécula de unión. Por ejemplo, un polipéptido multifuncional puede ser una molécula de unión multifuncional. Un ejemplo de polipéptido multifuncional descrito en el presente documento es una molécula de unión multifuncional que comprende un dominio antagonista del NGF, por ejemplo, un dominio peptídico que bloquea, reduce o inhibe una o más funciones naturales del NGF, y un dominio antagonista del TNF α , por ejemplo, un dominio peptídico que bloquea, reduce o inhibe una o más funciones naturales

25 del TNF α .

Un grupo de polipéptidos multifuncionales proporcionados en el presente documento son moléculas de unión multiespecíficas, por ejemplo, moléculas de unión que incluyen uno o más dominios de unión a anticuerpos, por ejemplo, un "anticuerpo multiespecífico", uno o más dominios de unión no a anticuerpos, por ejemplo, un receptor

30 señuelo o una combinación de los mismos. Las moléculas de unión multiespecíficas, por ejemplo, que incluyen uno o más dominios de unión a anticuerpos, uno o más dominios de unión no a anticuerpos, o una combinación de los mismos, son moléculas con dominios de unión capaces de reconocer específicamente y unirse a al menos dos epítopos diferentes. Los diferentes epítopos pueden estar dentro de la misma molécula (por ejemplo, el mismo NGF) o en diferentes moléculas de modo que, por ejemplo, moléculas de unión multiespecíficas que pueden reconocer y unirse específicamente NGF, así como otra molécula que contiene epítopos, por ejemplo, TNF α , tal que la molécula de

35 unión multiespecífica reconoce específicamente a NGF y TNF α .

Las técnicas para fabricar moléculas de unión multiespecíficas, por ejemplo, que incluyen uno o más dominios de unión a anticuerpos, uno o más dominios de unión no a anticuerpos, o una combinación de los mismos, están disponibles en la técnica (Dimasi, N., et al., 2009, J Mol Biol. 393: 672-92; Milstein et al., 1983, Nature 305: 537-539; Brennan et al., 1985, Science 229: 81; Suresh et al., 1986, Methods in Enzymol. 121: 120; Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10: 3655-3659; Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175: 217-225; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148: 1547-1553; Gruber et al., 1994, J. Immunol. 152: 5368; y la patente de los Estados Unidos No. 5.731.168). También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos (Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991)).

40

El término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a un objetivo, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos,

50 triespecíficos, tetraespecíficos, etc., generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno siempre que los anticuerpos exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos)

55 de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), de acuerdo con la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas.

En algunas realizaciones, una molécula de unión "de bloqueo", por ejemplo, un anticuerpo de bloqueo o una molécula de unión "antagonista", como por ejemplo, un anticuerpo antagonista o proteína de fusión es aquella que inhibe o

60

reduce la actividad biológica del antígeno al cual se une, tal como NGF o TNF α . En ciertos aspectos, los anticuerpos de bloqueo o moléculas de unión a antagonista inhibe sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. Por ejemplo, la actividad biológica se puede reducir en un 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, o incluso 100%. Los "antagonistas" y los "dominios antagonistas" como se usan en el presente documento incluyen polipéptidos u otras moléculas que se unen a su objetivo (por ejemplo, TNF α o NGF), bloqueando o inhibiendo así al objetivo de la interacción con un receptor. Por lo tanto, los antagonistas del NGF y/o TNF α incluyen moléculas que bloquean o inhiben la interacción del NGF con la neurotrofina trkA o p75, o la interacción de TNF α con TNFR-1 o TNFR-2. Los antagonistas del NGF y/o TNF α también incluyen moléculas que reducen la fosforilación de p38 y/o la fosforilación de ERK. Los ejemplos de antagonistas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y péptidos receptores no señalizadores solubles, específicos del objetivo, ("receptores señuelo", o fragmentos de unión a ligando de los mismos).

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Esta divulgación también proporciona fragmentos de unión a antígeno de moléculas que no se unen a anticuerpo, descritas en otra parte del presente documento.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogéneos involucrada en el reconocimiento y la unión altamente específicos de un único determinante antigénico, o epítipo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término "anticuerpo monoclonal" abarca anticuerpos monoclonales intactos y de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), mutantes de cadena única (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a tales anticuerpos elaborados de varias maneras, incluyendo por hibridoma, selección en fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas de inmunoglobulinas específicas, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de las mismas que contienen secuencias mínimas no humanas (por ejemplo, murinas). Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) se reemplazan por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo o hámster) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones et al., 1986, Nature, 321: 522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332: 323-327; Verhoeven et al., 1988, Science, 239: 1534-1536). En algunos casos, los residuos de la región marco Fv (FR o FW) de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de residuos adicionales ya sea en la región marco Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos o tres dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana, mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región o dominio constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente el de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados se describen en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.225.539 o 5.639.641.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, sola o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten en cuatro regiones marco (FR o FW) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5a ed., 1991, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda Md)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al., (1997) J. Molec. Biol. 273: 927-948). Además, las combinaciones de estos dos enfoques a veces se usan en la técnica para determinar las CDR.

El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5ª Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland (1991)).

La numeración de posición de aminoácidos como en Kabat, se refiere al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991) Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener

menos aminoácidos o más correspondientes a un acortamiento o inserción en una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de aminoácido único (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia "estándar" numerada de Kabat. Chothia por el contrario se refiere a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). El extremo del bucle CDR-H1 de Chothia cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presente, el bucle termina en 32; si únicamente 35A está presente, el bucle termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizadas por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. en la Tabla 1 a continuación se proporciona una comparación.

Tabla 1: Comparación de sistemas de numeración de anticuerpos

Bucle	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		(Numeración de Kabat)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Numeración de Chothia)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

El término "anticuerpo humano" significa un anticuerpo humano nativo o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo humano nativo, elaborado usando cualquier técnica conocida en el arte. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano de cadena pesada y/o ligera tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos cadena ligera murina y de cadena pesada humana.

El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Típicamente, la región variable de las cadenas ligera y pesada corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en los anticuerpos derivados de otro (generalmente humano) para evitar provocar una respuesta inmune en esa especie. Las moléculas de unión multiespecíficas, por ejemplo, que incluyen uno o más dominios de unión a anticuerpo, uno o más dominios de unión que no son de anticuerpo, o una combinación de los mismos, por ejemplo, los antagonistas del TNF α y/o los antagonistas del NGF proporcionados en el presente documento pueden comprender regiones constantes de anticuerpos (por ejemplo, regiones Fc) en las que al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante ha sido eliminada o bien alterada para proporcionar las características bioquímicas deseadas, tal como el aumento de la localización tumoral o la vida media reducida en suero en comparación con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o inalterada. Las regiones constantes modificadas proporcionadas en el presente documento pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o en el dominio constante de la cadena ligera (CL). En algunos aspectos, uno o más dominios constantes se pueden eliminar parcial o totalmente. En algunos aspectos, se puede eliminar todo el dominio CH2 (constructos de Δ CH2). Véase, por ejemplo, Oganessian V, et al., 2008 Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 64: 700-4; Oganessian V, et al., Mol Immunol. 46: 1750-5; Dall'Acqua, W.F., et al., 2006. J. Biol. Chem 281: 23514-23524; y Dall'Acqua, et al., 2002. J. Immunol. 169: 5171-5180.

El término "epítopo" o "determinante antigénico" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a esa porción de un antígeno capaz de ser reconocida y específicamente unida por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítomos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos y aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente tras la desnaturalización de la proteína, mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario se pierden normalmente tras la desnaturalización de la proteína. Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Un epítopo como se describe en este documento no necesita definirse hasta los aminoácidos específicos que forman el epítopo. En algunos aspectos, se puede identificar un epítopo examinando la unión a subunidades peptídicas de un antígeno polipeptídico, o examinando la competencia de unión al antígeno por un grupo de anticuerpos específicos de antígeno.

Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se entiende cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea el diagnóstico, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen humanos, animales domésticos, animales de granja, animales deportivos y animales de zoológico, incluidos, por ejemplo, humanos, primates no humanos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, vacas, osos, etc.

Los términos "composición" y "composición farmacéutica" se refieren a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto para el cual se administraría la composición, tales composiciones pueden ser estériles.

Como se usa en el presente documento, los términos "cantidad efectiva" y "cantidad terapéuticamente efectiva" se refieren a una cantidad de una o más composiciones terapéuticas efectivas para controlar el dolor en un sujeto. El término "control del dolor" y equivalentes gramaticales se usa en el presente documento para describir cualquier efecto beneficioso o deseable en un sujeto que necesita control del dolor. Por ejemplo, una cantidad efectiva de una o más composiciones terapéuticas descritas en el presente documento puede, por ejemplo, prevenir el dolor, mantener un nivel tolerable de dolor, aliviar el dolor, reducir el dolor, minimizar el dolor o eliminar el dolor en el sujeto.

El término "administrar" como se usa en el presente documento se refiere a administrar a un sujeto una o más composiciones terapéuticas descritas en el presente documento, por ejemplo, un polipéptido bifuncional que comprende un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α , una composición terapéutica que comprende una combinación de un antagonista del NGF y un antagonista del TNF α , o composiciones terapéuticas separadas, una que comprende un antagonista del NGF y otra que comprende un antagonista del TNF α . El término "coadministración" se refiere a la administración a un sujeto de dos o más composiciones terapéuticas, por ejemplo, una que comprende un antagonista del NGF y otra que comprende un antagonista del TNF α . Como se usa en el presente documento, la coadministración incluye, pero no requiere que las dos o más composiciones terapéuticas se administren al sujeto simultáneamente. Las dos o más composiciones terapéuticas pueden administrarse al sujeto secuencialmente, por ejemplo, con treinta minutos de diferencia, una hora de diferencia, dos horas de diferencia, tres horas de diferencia, cuatro horas de diferencia o cinco o más horas de diferencia. La secuencia y el momento de una coadministración como se describe en el presente documento pueden ser fijos o pueden variar de acuerdo con el criterio de un profesional de la salud.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se refieren a un compuesto polimérico compuesto por residuos de nucleótidos unidos covalentemente. Los polinucleótidos pueden ser ADN, ADNc, ARN, monocatenarios o bicatenarios, vectores, plásmidos, fagos o virus.

El término "vector" significa un constructo, que es capaz de administrar y expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes condensadores catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucariotas, tales como las células productoras.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y los no aminoácidos pueden interrumpirlo. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de marcación. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluidas cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales

ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. En ciertos aspectos, las sustituciones conservadoras en las secuencias de polipéptidos y anticuerpos proporcionados en el presente documento no anulan la unión u otra actividad funcional del polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos que no afectan la función son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell et al., *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., *Protein Eng.* 12: 879-884 (1999) y Burks et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997)).

Molécula de unión que comprende un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α

Esta divulgación proporciona un polipéptido bifuncional que comprende un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α . En ciertos aspectos, la administración de una cantidad efectiva de un polipéptido bifuncional proporcionado en este documento puede controlar el dolor, en un sujeto que lo necesite, más efectivamente que una cantidad equivalente del antagonista del NGF o el antagonista del TNF α administrado solos. Los polipéptidos bifuncionales proporcionados en el presente documento pueden incluir el dominio antagonista del NGF y el dominio antagonista del TNF α en cualquier orden, estructura o conformación. Cualquier antagonista del NGF o antagonista del TNF α adecuado puede ser parte de un polipéptido bifuncional proporcionado en este documento. Los ejemplos de antagonistas del NGF y antagonistas del TNF α se describen en otra parte en esta divulgación.

En ciertos aspectos, el antagonista del NGF es una molécula que no es anticuerpo, o un dominio de unión de la misma, capaz de inhibir la actividad del NGF, por ejemplo, un fragmento de TrkA soluble de unión a NGF. En ciertos aspectos, el antagonista del NGF es un anticuerpo anti-NGF, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los antagonistas anti-NGF adecuados, por ejemplo, los anticuerpos antagonistas pueden inhibir la unión del NGF a TrkA, p75NRT, o tanto a TrkA como a p75NRT. En ciertos aspectos, un antagonista anti-NGF, por ejemplo, un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo para usar en una molécula bifuncional provista en el presente documento, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, puede bloquear preferentemente la unión del NGF a TrkA sobre la unión del NGF a p75NRT.

Los ejemplos de anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso en polipéptidos bifuncionales, por ejemplo, moléculas de unión multiespecíficas descritas en el presente documento están disponibles en la publicación de la solicitud de los estados Unidos No. 2008/0107658. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo se une al mismo epítipo que, puede inhibir competitivamente, o puede unirse al NGF con una mayor afinidad que el anticuerpo anti-NGF MEDI-578. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo se une a NGF humano y/o NGF de rata con una afinidad de o menor a 1, 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3 o 0,2 nM. Por ejemplo, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede unirse a NGF humano con una afinidad de aproximadamente 0,2-0,8; 0,2-0,7; 0,2-0,6; 0,2-0,5 y/o 0,25-0,44 nM y NGF de rata con una afinidad de aproximadamente 0,2-0,9; 0,2-0,8; y/o 0,25-0,70 nM.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo es MEDI-578. MEDI-578 se divulga en la publicación de la solicitud de los Estados Unidos No. 2008/0107658 como el clon 1252A5. En otros aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo es tanezumab (RN-624), un mAb anti-NGF humanizado (Pfizer; descrito en Kivitz et al., (2013) *PAIN*, 154, 9, 1603-1611), fulranumab, un mAb anti-NGF completamente humano (Amgen; descrito en Sanga et al., *PAIN*, Volumen 154, Publicación 10, octubre de 2013, páginas 1910-1919); REGN475/SAR164877, un mAb anti-NGF completamente humano (Regeneron/Sanofi-Aventis); ABT-110 (PG110), un mAb anti-NGF humanizado (Abbott Laboratories). Un anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo incluido en un polipéptido bifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica proporcionada en el presente documento, puede ser, por ejemplo, humanizada, quimérica, primatizada o completamente humana.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende los dominios HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de MEDI-578, variantes de las CDR de cadena pesada de MEDI-578 con hasta una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede comprender una HCDR1 con la secuencia de aminoácidos exacta de la SEQ ID NO: 4 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 con una o más, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos. De manera similar, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede comprender una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos exacta de la SEQ ID NO: 5 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 con una o más, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos. Asimismo, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede comprender una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos exacta de la SEQ ID NO: 6 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 con una o más, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos. En ciertos aspectos, la HCDR3 puede comprender la secuencia de aminoácidos SSRIYDFNSALISYYDMDV (SEQ ID NO: 11) o SSRIYDMISLQPYDMDV (SEQ ID NO: 12).

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende los dominios LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de MEDI-578, variantes de las CDR de cadena ligera de MEDI-578 con hasta una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede comprender

- una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos exacta de la SEQ ID NO: 8 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 con una o más, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos. De manera similar, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede comprender una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos exacta de la SEQ ID NO: 9 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 con una o más, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos. Del mismo modo, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede comprender una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos exacta de la SEQ ID NO: 10 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 con una o más, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de VH al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VH de la SEQ ID NO: 3.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de VL al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VL de la SEQ ID NO: 7.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de VH al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VH de la SEQ ID NO: 94.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de VL al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VL de la SEQ ID NO: 95.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende los dominios HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de cualquiera de las SEQ ID NOs: 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 y 96, o variantes de las mismas con hasta una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende los dominios LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de cualquiera de las SEQ ID NOs: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87 y 97, o variantes de las mismas con hasta una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de VH al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 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 y 96. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VH de cualquiera de las SEQ ID NOs: 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 y 96.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de VL al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87 y 97. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VL de cualquiera de las SEQ ID NOs: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87 y 97.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende los dominios HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del NGF-NG, variantes de las CDR de cadena pesada del NGF-NG con hasta una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede comprender un HCDR1 con la secuencia de aminoácidos exacta de la SEQ ID NO: 88 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88 con una o más, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos. De manera similar, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede comprender una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos exacta de la SEQ ID NO: 89 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89 con una o más,

por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos. Asimismo, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede comprender una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos exacta de la SEQ ID NO: 90 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90 con una o más, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende los dominios LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del NGF-NG, variantes de las CDR de cadena ligera de NGF-NG con hasta una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede comprender una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos exacta de la SEQ ID NO: 91 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91 con una o más, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos. De manera similar, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede comprender una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos exacta de la SEQ ID NO: 92 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92 con una o más, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos. Asimismo, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo puede comprender una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos exacta de la SEQ ID NO: 93 o con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93 con una o más, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de VH al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VH de la SEQ ID NO: 24.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de VL al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VL de la SEQ ID NO: 26.

Un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica como se proporciona en esta divulgación puede comprender un anticuerpo anti-NGF completo, es decir, un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas en un formato H₂L₂. Cuando el anticuerpo anti-NGF es un anticuerpo completo, uno o más dominios antagonistas del TNF α pueden fusionarse con el extremo terminal N o el extremo terminal C de una o más cadenas pesadas del anticuerpo anti-NGF o con el extremo terminal N o el extremo terminal C de una o más cadenas ligeras del anticuerpo anti-NGF. Alternativamente, un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica como se proporciona en esta divulgación puede comprender un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-NGF. En ciertos aspectos, un fragmento de anticuerpo anti-NGF puede comprender cualquier porción de los dominios constantes del anticuerpo o puede comprender solo los dominios variables. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos anti-NGF para su inclusión en un polipéptido bifuncional, por ejemplo, molécula de unión multiespecífica, incluyen, pero no se limitan a fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)₂ o fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv).

En ciertos ejemplos de composiciones proporcionados en el presente documento, el anticuerpo anti-NGF es un fragmento scFv, por ejemplo un fragmento scFv de MEDI-578, o una variante de unión a NGF del mismo. En ciertos ejemplos de composiciones proporcionados en el presente documento, el anticuerpo anti-NGF es un fragmento scFv, por ejemplo, un fragmento scFv del NGF-NG, o una variante de unión a NGF del mismo. Un polipéptido scFv anti-NGF puede comprender los dominios VH y VL en cualquier orden, ya sea N-VH-VL-C o N-VL-VH-C. Las moléculas del ScFv generalmente son manipuladas de tal manera que los dominios VH y VL están conectados a través de un enlazador flexible. Se pueden encontrar ejemplos de estructuras de scFv, que incluyen diversos enlazadores en Dimasi, N. et al., J Mol Biol. 393: 672-92 (2009), y en la publicación PCT No. WO 2013/070565. Tal como lo entienden los expertos en la técnica, los fragmentos de anticuerpos scFv pueden tener una estabilidad reducida en relación con los dominios variables existentes en una conformación Fab estándar. En algunos aspectos, el scFv puede estabilizarse estructuralmente mediante la introducción de mutaciones estabilizadoras o mediante la introducción de enlaces disulfuro entre cadenas (por ejemplo, estabilizado por SS). Sin embargo, no se requieren mutaciones estabilizadoras y/o un enlace disulfuro entre cadenas introducido y, en ciertos aspectos, no está presente. Se encuentran disponibles varios métodos reconocidos en la técnica para estabilizar los polipéptidos scFv.

Los enlazadores pueden usarse para unir dominios/regiones de polipéptidos bifuncionales proporcionados en el presente documento. Los enlazadores se pueden usar para conectar el dominio antagonista del NGF y el dominio antagonista del TNF α de una molécula bifuncional, y también se pueden usar para interconectar las cadenas pesada y ligera variables de un scFv. Un ejemplo no limitante de un enlazador es una cadena polipeptídica que comprende al menos 4 residuos. Las porciones de dichos enlazadores pueden ser flexibles, hidrófilas y tener poca o ninguna estructura secundaria propia (porciones enlazadoras o porciones enlazadoras flexibles). Los enlazadores de al menos 4 aminoácidos se pueden usar para unir dominios y/o regiones que se colocan cerca uno del otro después de que se haya ensamblado una molécula de polipéptido bifuncional. También se pueden usar enlazadores más largos. Por lo tanto, los enlazadores pueden ser de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,

20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, residuos. Los enlazadores también pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 100-175 residuos. Cuando se usan múltiples enlazadores para interconectar porciones de una molécula de polipéptido bifuncional, los enlazadores pueden ser iguales o diferentes (por ejemplo, la misma o diferente longitud y/o secuencia de aminoácidos).

5 El o los enlazadores en una molécula de polipéptido bifuncional facilitan la formación de la estructura deseada. Los enlazadores pueden comprender los residuos de (Gly-Ser)_n (en. los que n es un número entero de al menos uno, dos y hasta, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 10, 20, 50, 100 o más), con algunos residuos de Glu o Lys dispersos por todas partes para aumentar la solubilidad. Alternativamente, ciertos enlazadores no comprenden ningún residuo de serina, por ejemplo, cuando el enlazador está sujeto a glicosilación ligada a O. En algunos aspectos, los enlazadores pueden
10 contener residuos de cisteína, por ejemplo, si se usa la dimerización de enlazadores para llevar los dominios de un polipéptido bifuncional a su configuración plegada adecuadamente. En algunos aspectos, un polipéptido bifuncional puede comprender al menos uno, dos, tres, cuatro o más enlazadores de polipéptidos que unen dominios del polipéptido.

15 En algunos aspectos, un enlazador polipeptídico puede comprender 1-50 residuos, 1-25 residuos, 25-50 residuos o 30-50 residuos. En algunos aspectos, el enlazador polipeptídico puede comprender una porción de una fracción de Fc. Por ejemplo, en algunos aspectos, el enlazador polipeptídico puede comprender una porción del dominio de bisagra de inmunoglobulina de un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4 o una variante del mismo.

20 En algunos aspectos, un enlazador polipeptídico puede comprender o consiste en un enlazador de gly-ser. Como se usa en este documento, el término "enlazador de gly-ser" se refiere a un péptido que consiste en residuos de glicina y serina. Un ejemplo de enlazador de gly-ser comprende una secuencia de aminoácidos de la fórmula (Gly₄Ser)_n, en la que n es un número entero de al menos uno, dos y hasta, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 10, 20, 50, 100 o más. En algunos aspectos, un enlazador polipeptídico puede comprender al menos una porción de una región bisagra (por ejemplo, derivada de una molécula de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) y una serie de residuos de aminoácidos de gly-ser (por ejemplo, un enlazador como (Gly₄Ser)_n).

25 Cuando un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, comprende un scFv, un enlazador flexible puede conectar las cadenas pesada y ligera del scFv. Este enlazador flexible generalmente no incluye una porción de bisagra, sino que es un enlazador de gly-ser u otro enlazador flexible. La longitud y la secuencia de aminoácidos de un enlazador flexible que interconecta dominios de un scFv se puede seleccionar y optimizar fácilmente.

30 En ciertos aspectos, un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, puede comprender un fragmento scFv anti-NGF que comprende, desde el extremo terminal N al extremo terminal C, un VH, una secuencia enlazadora de 15 aminoácidos (GGGGS)₃, y un VL. En ciertas realizaciones, el enlazador que une el VH y el VL del scFv es una secuencia enlazadora de 20 aminoácidos (GGGGS)₄. En ciertos aspectos, el VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En ciertos aspectos, el VL comprende la secuencia de
35 aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En ciertas realizaciones, el VH comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 24, 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, 94 y 96. En ciertas realizaciones, el VL comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 26, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 95 y 97. En ciertos aspectos, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las
40 SEQ ID NOs: 3, 24, 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, 94 y 96. En ciertos aspectos, el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90 %, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7, 26, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 95 y 97.

45 En otros aspectos, la estabilidad del polipéptido puede mejorarse mediante la adición de un enlace disulfuro entre cadenas entre el dominio VH y el dominio VL modificando ciertos residuos dentro del dominio VH y VL con residuos de cisteína. Véase, por ejemplo, Michaelson, J. S., et al. (2009) MABs 1, 128-41; Brinkmann, U., et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90, 7538-42; Young, N. M., et al., (1995) FEBS Lett 377, 135-9. Por ejemplo, el residuo de glicina en las posiciones 100, 101 o 102 del VL puede modificarse a un residuo de cisteína y el residuo de glicina en la posición 44 del VH puede modificarse a un residuo de cisteína.

50 Un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica como se proporciona en el presente documento puede incluir un dominio antagonista del TNFα. En ciertos aspectos, un dominio antagonista del TNFα puede inhibir la unión del TNFα a un receptor del TNF (TNFR) en la superficie de las células, bloqueando así la actividad del TNF.

55 En ciertos aspectos, el dominio antagonista del TNFα de un polipéptido multifuncional como se proporciona en el presente documento es un anticuerpo anti-TNFα o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-TNFα es infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de estos anticuerpos.

- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento del mismo se une al mismo epítipo que puede inhibir de manera competitiva o puede unirse al TNF α con mayor afinidad que cualquiera de los anticuerpos anti-TNF α infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab, o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de estos anticuerpos.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α es infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab, o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de estos anticuerpos. La estructura y las secuencias de estos anticuerpos anti-TNF α están fácilmente disponibles para el experto en la materia, y pueden incluirse en un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, como se describe en el presente documento sin experimentación excesiva. Un anticuerpo anti-TNF α o fragmento del mismo incluido en un polipéptido multifuncional puede ser, por ejemplo, humanizado, quimérico, primatizado o completamente humano.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende los dominios HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab, o variantes de las CDR de cadena pesada de infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, o golimumab con hasta una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende los dominios LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab, o variantes de las CDR de cadena pesada del infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, o de golimumab con hasta una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α o un fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de VH al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de VH de infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VH de infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de VL al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de VL de infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α o su fragmento comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VL de infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de VH al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VH de la SEQ ID NO: 28.
- En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento del mismo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de VL al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α o fragmento del mismo comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de VL de la SEQ ID NO: 29.
- Un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, como se proporciona en esta divulgación, puede comprender un anticuerpo anti-TNF α completo, es decir, un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas en un formato H₂L₂. Cuando el anticuerpo anti-TNF α es un anticuerpo completo, uno o más dominios antagonistas del NGF pueden fusionarse al extremo terminal N o al extremo terminal C de una o más cadenas pesadas del anticuerpo anti-TNF α o al extremo terminal N o al extremo terminal C de una o más cadenas ligeras del anticuerpo anti-TNF α . Alternativamente, un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, como se proporciona en esta divulgación, puede comprender un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-TNF α . En ciertos aspectos, un fragmento de anticuerpo anti-TNF α puede comprender cualquier porción de los dominios constantes del anticuerpo o puede comprender solo los dominios variables. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo anti-TNF α para su inclusión en un polipéptido multifuncional incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)₂ o fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv).
- En algunos aspectos, la molécula multifuncional es ndimab varB, que es una molécula que comprende un anticuerpo anti-TNF α completo, es decir, un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas en un formato H₂L₂, con scFv de MEDI-578 fusionado al extremo terminal C de la cadena pesada del anticuerpo anti-TNF α . Ndimab varB comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20, y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22. En algunos aspectos, la molécula bifuncional comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 20, y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 22.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-TNF α es un fragmento scFv, por ejemplo un fragmento scFv derivado de infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab, o una variante de unión a TNF α del mismo. Un polipéptido de scFv anti-TNF α puede comprender los dominios VH y VL en cualquier orden, ya sea N-VH-VL-C o N-VL-VH-C. Las moléculas de ScFv se manipulan típicamente de tal manera que los dominios VH y VL están conectados a través de un enlazador flexible y pueden asumir una serie de estructuras diferentes, como se describió anteriormente. Un polipéptido de scFv anti-TNF α , se puede estabilizar también como se describió anteriormente.

En ciertos aspectos, el antagonista del TNF α es un fragmento soluble de unión a TNF α de un receptor de TNF, por ejemplo, TNFR-1 o TNFR-2, o una variante del mismo o un fragmento soluble del mismo. En ciertos aspectos, el fragmento soluble de TNFR-1 es un fragmento de 55 kD. En ciertas realizaciones, el fragmento de TNFR-2 soluble es un fragmento de 75 kD. En ciertos aspectos, el fragmento del receptor de TNF se fusiona con un polipéptido heterólogo, por ejemplo, un fragmento Fc de inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio Fc de IgG1. En ciertos aspectos, el antagonista del TNF α comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, o un fragmento de unión al TNF α del mismo. La porción de TNFR-2 comprende los aminoácidos 1 a 235 de la SEQ ID NO: 13. En ciertos aspectos, una variante de un fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los aminoácidos 1 a 235 de la SEQ ID NO: 13. En ciertos aspectos, una variante de un fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α comprende los aminoácidos 1 a 235 de la SEQ ID NO: 13, excepto, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 20, 40 o 50 inserciones, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos. La porción Fc de IgG1 comprende los aminoácidos 236 a 467 de la SEQ ID NO: 13. En ciertos aspectos, una variante de un fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α puede fusionarse con una porción Fc de cualquier anticuerpo humano o no humano, o con cualquier otra proteína o sustancia no proteica que proporcionaría estabilidad, por ejemplo, albúmina o polietilenglicol. En ciertos aspectos, una variante de un fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100 % idéntica a los aminoácidos 236 a 467 de la SEQ ID NO: 13. En ciertos aspectos, una variante de un fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α comprende los aminoácidos 236 a 467 de la SEQ ID NO: 13, excepto, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 20, 40 o 50 inserciones, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos. En ciertos aspectos, una variante de un fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 13. En ciertos aspectos, una variante de un fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α comprende la SEQ ID NO: 13, excepto, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 20, 40 o 50 inserciones, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos.

En ciertos aspectos, el fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α es una proteína de fusión de cadena sencilla. En ciertos aspectos, el fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α es un dímero de dos proteínas de fusión, asociadas, por ejemplo, a través de enlaces disulfuro entre los dos dominios Fc.

Un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, como se proporciona en el presente documento, puede tener una variedad de diferentes estructuras y conformaciones. En un aspecto, un polipéptido multifuncional como se proporciona en el presente documento comprende una proteína de fusión en la que el dominio antagonista del NGF, como se describió anteriormente, se fusiona con el dominio antagonista del TNF α , como se describió anteriormente, a través de un enlazador flexible. Ejemplos de enlazadores se describen en otra parte del presente documento. En ciertos aspectos, el polipéptido multifuncional comprende un homodímero de la proteína de fusión.

En un ejemplo de un aspecto, se proporciona un polipéptido multifuncional en el que el antagonista del NGF es un dominio scFv anti-NGF derivado, por ejemplo, de MEDI-578 y el antagonista del TNF α es un fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α fusionado en su extremo terminal carboxilo a un dominio Fc de inmunoglobulina. El scFv anti-NGF puede fusionarse, en algunos aspectos, con el extremo terminal carboxilo del dominio Fc de inmunoglobulina a través de un enlazador. En ciertos aspectos, los monómeros de este polipéptido multifuncional forman un homodímero con cada subunidad que comprende, desde el extremo terminal N hasta el extremo terminal C, un fragmento de TNFR-2 de 75 kD de unión a TNF α , un dominio IgG1Fc humano, un enlazador de 10 aminoácidos (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 98), un VH anti-NGF que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, una secuencia enlazadora de 15 aminoácidos (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 15) y un VL anti-NGF que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En un aspecto, el polipéptido multifuncional es TNFR2-Fc_VH #4, que comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el polipéptido multifuncional comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica a la SEQ ID NO: 14.

En otro ejemplo de un aspecto, el polipéptido multifuncional comprende, desde el extremo terminal N al extremo terminal C, un fragmento de TNFR-2 de 75kD de unión a TNF α , un dominio IgG1Fc humano, un enlazador de 10 aminoácidos (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 98), un VH anti-NGF que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94, una secuencia enlazadora de 20 aminoácidos (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19) y un VL anti-NGF que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95. En algún aspecto, el polipéptido multifuncional es TNFR2-Fc_varB, que comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, el polipéptido multifuncional comprende un homodímero de

un polipéptido de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica a la SEQ ID NO: 17.

Polipéptidos

Los polipéptidos como se proporcionan en el presente documento, por ejemplo, polipéptidos multifuncionales que comprenden un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α , o polipéptidos individuales que comprenden un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α , respectivamente, pueden ser polipéptidos recombinantes, derivados de polipéptidos naturales, o polipéptidos sintéticos. Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos pueden variarse sin un efecto significativo de la estructura o función de la proteína. Por lo tanto, la divulgación proporciona además variaciones de polipéptidos proporcionados en el presente documento que tienen actividad sustancial o que incluyen dominios antagonistas del NGF y dominios antagonistas del TNF α . Tales mutantes incluyen eliminaciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones tipo.

Los polipéptidos y análogos pueden modificarse adicionalmente para contener fracciones químicas adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Esas fracciones derivatizadas pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Las fracciones también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario deseable de las proteínas. Se puede encontrar una visión general de esas fracciones en REMINGTON'S FARMACEUTICAL SCIENCES, 20^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

En ciertos aspectos, un polipéptido multifuncional proporcionado en el presente documento puede incluir un dominio de unión a NGF o TNF α que no es un anticuerpo. En la técnica se conoce una variedad de métodos para identificar y producir polipéptidos que no son anticuerpos que se unen con alta afinidad a una proteína objetivo. Véase, por ejemplo, Skerra, Curr. Opin. Biotechnol., 18: 295-304 (2007), Hosse et al., Protein Science, 15: 14-27 (2006), Gill et al., Curr. Opin. Biotechnol., 17: 653-658 (2006), Nygren, FEBS J., 275: 2668-76 (2008), y Skerra, FEBS J., 275: 2677-83 (2008). En ciertos aspectos, la tecnología de presentación en fagos se puede usar para identificar/producir los polipéptidos multifuncionales adecuados. En ciertos aspectos, un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica proporcionada en el presente documento puede comprender un armazón de proteínas de un tipo seleccionado del grupo que consiste en proteína A, una lipocalina, un dominio de fibronectina, un dominio de repetición de consenso de anquirina y tiorredoxina.

Polinucleótidos, vectores y células huésped.

Esta divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido multifuncional que comprende un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α . Esta divulgación proporciona además moléculas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos que codifican polipéptidos individuales que comprenden, respectivamente, un antagonista del NGF y un antagonista del TNF α . En ciertos aspectos, tales polinucleótidos codifican un dominio peptídico que se une específicamente a NGF o un fragmento del mismo, y también se une a TNF α o un fragmento del mismo. Por ejemplo, esta descripción proporciona un polinucleótido que codifica un dominio de polipéptido que comprende un anticuerpo anti-NGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un dominio de polipéptido que comprende un antagonista del TNF α , tal como un anticuerpo anti-TNF α o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una porción de unión a TNF α soluble de un receptor de TNF, por ejemplo, TNFR2. Los polinucleótidos pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético; y puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena codificadora o la cadena no codificadora (antisentido).

En algunas realizaciones, el polinucleótido aislado que codifica un polipéptido multifuncional descrito en el presente documento comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 16, 18 o 99, o fragmento de la misma, o una secuencia de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 16, 18 o 99, o fragmentos de la misma.

Los polipéptidos aislados descritos en este documento pueden producirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Dichos métodos van desde métodos directos de síntesis de proteínas hasta la construcción de una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptidos aislados y que expresa esas secuencias en un huésped transformado adecuado. En algunos aspectos, una secuencia de ADN se construye utilizando tecnología recombinante aislando o sintetizando una secuencia de ADN que codifica un polipéptido multifuncional que comprende un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α , o polipéptidos individuales que comprenden un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α , respectivamente. Por consiguiente, esta descripción proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido bifuncional que comprende un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α como se describió en detalle anteriormente. Además se proporcionan polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos individuales que comprenden, respectivamente, un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α .

En algunos aspectos, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica de interés o polipéptidos individuales que comprenden un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α , respectivamente, puede construirse mediante síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Dichos oligonucleótidos pueden diseñarse con base en la secuencia de aminoácidos del

polipéptido multifuncional deseado y seleccionando aquellos codones que son favorecidos en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Se pueden aplicar métodos estándar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica un polipéptido multifuncional de interés. Por ejemplo, se puede usar una secuencia de aminoácidos completa para construir un gen retrotraducido. Además, se puede sintetizar un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido multifuncional particular o polipéptidos individuales. Por ejemplo, varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado pueden sintetizarse y luego ligarse. Los oligonucleótidos individuales contienen típicamente salientes 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

En ciertos aspectos, los polinucleótidos proporcionados en el presente documento pueden comprender la secuencia codificante para el polipéptido maduro fusionado en el mismo marco de lectura a una secuencia marcadora que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexahistidina suministrada por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un huésped bacteriano, o la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) derivada de la proteína hemaglutinina de la influenza cuando se usa un huésped mamífero (por ejemplo, células COS-7).

Los polinucleótidos proporcionados en el presente documento pueden contener además alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. En algunos aspectos, las variantes de polinucleótidos contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o eliminaciones silenciosas, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunos aspectos, las variantes de nucleótidos se producen mediante sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Las variantes de polinucleótidos se pueden producir por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un huésped particular (cambiar los codones en el ARNm humano por aquellos preferidos por un huésped bacteriano como *E. coli*).

También se proporcionan vectores y células que comprenden los polinucleótidos descritos en el presente documento. Una vez ensambladas (por síntesis, mutagénesis dirigida al sitio u otro método), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido aislado particular de interés pueden insertarse en un vector de expresión y unirse operativamente a una secuencia de control de expresión apropiada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. Esta divulgación proporciona tales vectores. La secuenciación de nucleótidos, el mapeo de restricción y la expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado pueden confirmar el ensamblaje adecuado. Como es bien sabido en la técnica, para obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen debe estar operativamente unido a secuencias de control de la expresión transcripcional y traduccional que sean funcionales en el huésped de expresión elegido.

En ciertos aspectos, los vectores de expresión recombinantes pueden usarse para amplificar y expresar ADN que codifica polipéptidos multifuncionales, por ejemplo, moléculas de unión multiespecíficas, que comprenden un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α , o polipéptidos individuales que comprenden un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α , respectivamente. Los vectores de expresión recombinantes son constructos de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican un polipéptido multifuncional o polipéptidos individuales que comprenden un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α , respectivamente, unidos operativamente a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados derivados de genes de mamíferos, microbios, virales o de insectos. Una unidad transcripcional generalmente comprende un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína, y (3) secuencias apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, como se divulga en detalle a continuación. Dichos elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. La capacidad de replicarse en un huésped, usualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes se pueden incorporar adicionalmente. Las regiones de ADN están unidas operativamente cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder secretor) se une operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está unido operativamente a una secuencia de codificación si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está operativamente unido a una secuencia de codificación si está posicionado de manera que permita la traducción. Los elementos estructurales destinados al uso en sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. Alternativamente, cuando la proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo de metionina en el extremo terminal N. Este residuo opcionalmente se puede escindir posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de la secuencia de control de expresión y el vector de expresión dependerá de la elección del huésped. Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de expresión huésped/vector. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *E. coli*, que incluyen pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de mayor intervalo de huéspedes, tales como M13 y fagos filamentosos de ADN monocatenario.

Esta divulgación proporciona además células huésped que comprenden polinucleótidos que codifican los polipéptidos proporcionados en el presente documento. Las células huésped adecuadas para la expresión de los polipéptidos proporcionados en el presente documento incluyen células procariotas, levaduras, insectos o eucariotas superiores bajo el control de promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe a continuación. También se pueden emplear sistemas de traducción sin células. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamíferos son descritos por Pouwels et al., (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985). Se puede encontrar información adicional sobre los métodos de producción de proteínas, incluida la producción de anticuerpos, por ejemplo, en la publicación de la patente de los Estados Unidos No. 2008/0187954, las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.413.746 y 6.660.501, y en la publicación internacional de patente No. WO 04009823.

También se pueden emplear ventajosamente diversos sistemas de cultivo de células de mamíferos o insectos para expresar proteínas recombinantes. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamíferos puede realizarse porque tales proteínas están generalmente plegadas correctamente, modificadas de manera apropiada y completamente funcionales. Los ejemplos de líneas celulares huésped adecuadas de mamífero incluyen las líneas HEK-293 y HEK-293T, las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (Cell 23: 175, 1981), y otras líneas celulares que incluyen, por ejemplo, células L, C127, 3T3, líneas de células de ovario de hámster chino (CHO), HeLa y BHK. Los vectores de expresión en mamíferos pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados unidos al gen que se va a expresar, y otras secuencias no transcritas flanqueantes 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tal como sitios necesarios de unión a ribosomas, un sitio de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de empalme, y secuencias de terminación de la transcripción. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos son revisadas por Luckow y Summers, Bio/Technology 6: 47 (1988).

Esta divulgación proporciona además un método para producir el polipéptido multifuncional como se describe en el presente documento, o para producir polipéptidos individuales que comprenden, respectivamente, un antagonista del NGF y un antagonista del TNF α . El método implica cultivar una célula huésped como se describió anteriormente en condiciones que promueven la expresión del polipéptido multifuncional o polipéptidos individuales, y la recuperación del polipéptido multifuncional o polipéptidos individuales.

Para la producción a largo plazo de alto rendimiento de proteínas recombinantes, es apropiada la expresión estable. Por ejemplo, se pueden manipular líneas celulares que expresen establemente el polipéptido multifuncional. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN foráneo, se puede permitir que las células manipuladas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse para manipular líneas celulares que expresan el polipéptido multifuncional.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos multifuncionales presentados en el presente documento se expresan en una línea celular con expresión transitoria del polipéptido multifuncional. La transfección transitoria es un proceso en el que el ácido nucleico introducido en una célula no se integra en el genoma o el ADN cromosómico de esa célula, sino que se mantiene como un elemento extracromosómico, por ejemplo, como un episoma, en la célula. Los procesos de transcripción del ácido nucleico del episoma no se ven afectados y se produce una proteína codificada por el ácido nucleico del episoma.

La línea celular, ya sea estable o transfectada transitoriamente, se mantiene en medio de cultivo celular y en condiciones conocidas en la técnica que dan como resultado la expresión y producción de polipéptidos. En ciertas realizaciones, los medios de cultivo de células de mamífero se basan en formulaciones de medios disponibles comercialmente, que incluyen, por ejemplo, DMEM o F12 de Ham. En algunas realizaciones, los medios de cultivo celular se modifican para soportar aumentos tanto en el crecimiento celular como en la expresión de proteínas biológicas. Como se usa en este documento, los términos "medio de cultivo celular", "medio de cultivo" y "formulación de medio" se refieren a una solución nutritiva para el mantenimiento, crecimiento, propagación o expansión de células en un entorno artificial *in vitro* fuera de un organismo multicelular o tejido. El medio de cultivo celular puede optimizarse para un uso específico de cultivo celular, que incluye, por ejemplo, medio de crecimiento de cultivo celular que está formulado para promover el crecimiento celular, o medio de producción de cultivo celular que está formulado para promover la producción de proteína recombinante. Los términos nutriente, ingrediente y componente pueden usarse indistintamente para referirse a los constituyentes que forman un medio de cultivo celular.

En diversas realizaciones, las líneas celulares se mantienen usando un método discontinuo de alimentación. Como se usa en el presente documento, "método discontinuo de alimentación" se refiere a un método mediante el cual un cultivo celular discontinuo de alimentación se suministra con nutrientes adicionales después de incubarse primero con un medio basal. Por ejemplo, un método discontinuo de alimentación puede comprender agregar medios suplementarios de acuerdo con un programa de alimentación determinado dentro de un período de tiempo dado. Por lo tanto, un

"cultivo celular discontinuo de alimentación" se refiere a un cultivo celular en el que las células, típicamente de mamífero, y el medio de cultivo se suministran al recipiente de cultivo inicialmente y los nutrientes de cultivo adicionales se alimentan, continuamente o en incrementos discretos, al cultivo durante el cultivo, con o sin recolección periódica de células y/o productos antes de la terminación del cultivo.

- 5 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende un medio basal y al menos un hidrolizado, por ejemplo, un hidrolizado a base de soja, un hidrolizado a base de levadura, o una combinación de los dos tipos de hidrolizados que dan como resultado un medio basal modificado. Los nutrientes adicionales a veces pueden incluir solo un medio basal, tal como un medio basal concentrado, o pueden incluir solo hidrolizados o hidrolizados concentrados. Los medios basales adecuados incluyen, pero no se limitan a medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), DME/F12, Medio esencial mínimo (MEM), medio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, medio esencial mínimo α . (alpha-MEM), medio esencial mínimo de Glasgow (G-MEM), PF CHO (véase, por ejemplo, medio libre de proteínas CHO (Sigma) o medio libre de suero EX-CELL.TM. 325 PF CHO, para células CHO sin proteínas (SAFC Bioscience) y medio de Dulbecco modificado de Iscove. Otros ejemplos de medios basales que pueden usarse en la tecnología de la presente invención incluyen el medio basal BME (Gibco-Invitrogen; el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, polvo) (Gibco-Invitrogen (# 31600)).

En ciertas realizaciones, el medio basal puede estar libre de suero, lo que significa que el medio no contiene suero (por ejemplo, suero fetal bovino (FBS), suero de caballo, suero de cabra o cualquier otro suero derivado de animales conocido por uno experto en la técnica) o medios libres de proteínas animales o medios químicamente definidos.

- 20 El medio basal puede modificarse para eliminar ciertos componentes no nutricionales que se encuentran en el medio basal estándar, tales como diversos tampones inorgánicos y orgánicos, tensioactivos y cloruro de sodio. La eliminación de dichos componentes del medio celular basal permite una mayor concentración de los componentes nutricionales restantes y puede mejorar el crecimiento celular general y la expresión de proteínas. Además, los componentes omitidos pueden agregarse nuevamente al medio de cultivo celular que contiene el medio celular basal modificado de acuerdo con los requisitos de las condiciones de cultivo celular. En ciertas realizaciones, el medio de cultivo celular contiene un medio celular basal modificado, y al menos uno de los siguientes nutrientes, una fuente de hierro, un factor de crecimiento recombinante; un tampón; un tensioactivo; un regulador de osmolaridad; una fuente de energía; e hidrolizados no animales. Además, el medio celular basal modificado puede contener opcionalmente aminoácidos, vitaminas o una combinación de aminoácidos y vitaminas. En algunas realizaciones, el medio basal modificado contiene además glutamina, por ejemplo, L-glutamina y/o metotrexato.

- 30 En algunas realizaciones, la producción de proteínas se lleva a cabo en gran cantidad mediante un proceso de biorreactor que utiliza métodos de biorreactor de alimentación discontinua, de perfusión o continua, conocidos en la técnica. Los biorreactores a gran escala tienen al menos 50 litros de capacidad, a veces más de 500 litros o de 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos biorreactores pueden usar impulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes. Los biorreactores a pequeña escala se refieren generalmente al cultivo celular en no más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y pueden variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros. Alternativamente, los biorreactores de un solo uso (SUB) pueden usarse para el cultivo a gran escala o en pequeña escala.

- 40 La temperatura, el pH, la agitación, la aireación y la densidad del inóculo pueden variar dependiendo de las células huésped utilizadas y la proteína recombinante a expresar. Por ejemplo, un cultivo celular de proteína recombinante puede mantenerse a una temperatura entre 30 y 45 grados Celsius. El pH del medio de cultivo puede controlarse durante el proceso de cultivo de modo que el pH se mantenga en un nivel óptimo, que puede ser para ciertas células huésped, dentro de un intervalo de pH de 6,0 a 8,0. Se puede usar un mezclador accionado por un impulsor para tales métodos de cultivo con agitación. La velocidad de rotación del impulsor puede ser de aproximadamente 50 a 200 cm/s de velocidad de punta, pero se pueden utilizar otros sistemas de transporte aéreo u otros sistemas de mezcla/aireación conocidos en la técnica, dependiendo del tipo de célula huésped que se cultive. Se proporciona aireación suficiente para mantener una concentración de oxígeno disuelto de aproximadamente 20% a 80% de saturación de aire en el cultivo, de nuevo, dependiendo de la célula huésped seleccionada que se esté cultivando. Alternativamente, un biorreactor puede rociar aire u oxígeno directamente en el medio de cultivo. Existen otros métodos de suministro de oxígeno, incluidos los sistemas de aireación sin burbujas que emplean aireadores de membrana de fibra hueca.

- 50 Purificación de proteínas

- Las proteínas producidas por un huésped transformado como se describió anteriormente se pueden purificar de acuerdo con cualquier método adecuado. Dichos métodos estándar incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía Intercambio iónico, de afinidad y de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Las etiquetas de afinidad tales como la hexahistidina, el dominio de unión a la maltosa, la secuencia de la capa de influenza y la glutatión-S-transferasa se pueden unir a la proteína para permitir una fácil purificación pasando por una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas también pueden caracterizarse físicamente utilizando técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X.

Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en medios de cultivo pueden concentrarse primero usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. Alternativamente, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Alternativamente, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Finalmente, una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) que emplean medios de RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene metilo colgante u otros grupos alifáticos, se pueden emplear para purificar aún más un agente de unión a NGF. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones, también se pueden emplear para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano puede aislarse, por ejemplo, mediante extracción inicial de sedimentos celulares, seguida de una o más etapas de concentración, desplazamiento salino, intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión por tamaño. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede emplearse para las etapas finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante se pueden alterar mediante cualquier método conveniente, incluido el ciclo de congelación-descongelación, sonicación, interrupción mecánica o el uso de agentes de lisis celular.

Los métodos conocidos en la técnica para purificar polipéptidos recombinantes también incluyen, por ejemplo, los descritos en las publicaciones de patente de los Estados Unidos Nos. 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005.

Composiciones farmacéuticas y composiciones para uso

Esta descripción proporciona composiciones para controlar o tratar el dolor en un sujeto, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido multifuncional antagonista del TNF α y NGF, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, como se proporciona en el presente documento para administración a un sujeto, o que comprende un antagonista del TNF α y un antagonista del NGF para la coadministración a un sujeto. En ciertos aspectos, el sujeto es humano.

Esta divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido multifuncional antagonista del TNF α y NGF, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, como se proporciona en el presente documento o que comprende una combinación de un antagonista del TNF α y un antagonista del NGF como se proporciona en el presente documento. En ciertos aspectos, las composiciones farmacéuticas comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas son útiles en el tratamiento del dolor, por ejemplo, dolor neuropático e inflamatorio (por ejemplo, osteoartrítico o reumatoide).

Los polipéptidos y composiciones multifuncionales que comprenden un antagonista del NGF y un antagonista del TNF α proporcionados en el presente documento pueden ser útiles en una variedad de aplicaciones que incluyen el control o tratamiento del dolor, por ejemplo, dolor neuropático. Las composiciones pueden usarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

En ciertos aspectos, la enfermedad, trastorno o afección tratada con el agente de unión a NGF (por ejemplo, un anticuerpo o polipéptido) se asocia con dolor. En ciertos aspectos, el dolor está asociado con dolor nociceptivo crónico, dolor lumbar crónico, dolor neuropático, dolor por cáncer, dolor por neuralgia postherpética (PHN) o afecciones por dolor visceral.

Esta divulgación proporciona una composición para controlar el dolor en un sujeto, que comprende una cantidad eficaz de un antagonista del factor de crecimiento nervioso (NGF) y un antagonista del factor de necrosis tumoral (TNF α) para la administración a un sujeto que necesita control del dolor, en la que la administración puede controlar el dolor en el sujeto de manera más efectiva que una cantidad equivalente del antagonista del NGF o el antagonista del TNF α administrados solos.

En ciertos aspectos, la administración es una coadministración de un antagonista del NGF y un antagonista del TNF α como terapia combinada. Como se discute en otra parte del presente documento, los componentes individuales se pueden administrar de forma simultánea o secuencial. El antagonista individual del NGF o el antagonista del TNF α pueden ser cualquiera de los antagonistas del NGF o TNF α proporcionados en el presente documento, por ejemplo, un fragmento del receptor soluble de TrkA de unión a NGF, un anticuerpo anti-NGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un fragmento de un receptor de TNF soluble de unión a TNF α , por ejemplo, TNFR-2, o un anticuerpo anti-TNF α o fragmento del mismo, por ejemplo, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab, o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de estos anticuerpos.

La coadministración puede comprender varias dosis de cada uno de los antagonistas según se requiera para controlar el dolor. En algunos aspectos, la coadministración puede incluir dosis más bajas o dosis menos frecuentes de cada componente de lo que normalmente se administraría como una terapia individual, lo que proporciona seguridad, conveniencia y economía adicionales.

En ciertos aspectos, las composiciones para usar en el control del dolor, de acuerdo a lo mencionado en el presente documento, comprenden un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, que comprende un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α . Los ejemplos de polipéptidos multifuncionales para uso en esta composición se describen en detalle en el presente documento. Con base en la divulgación, los polipéptidos multifuncionales adicionales útiles en estas composiciones serán evidentes para el experto en la materia.

Por control del dolor "más eficazmente" que los componentes administrados solos, se entiende que el tratamiento de combinación es más eficaz para controlar el dolor que las cantidades equivalentes ya sea del antagonista del NGF o del antagonista del TNF α administrados individualmente. En ciertos aspectos, y como se describe con más detalle a continuación, las composiciones para uso en el control del dolor proporcionadas en el presente documento pueden proporcionar eficacia sinérgica, por ejemplo, el efecto de la administración tanto del antagonista del NGF como del antagonista del TNF α puede proporcionar más que un efecto aditivo, o puede ser efectivo donde ni el antagonista del NGF ni el antagonista del TNF α son efectivos individualmente. En ciertos aspectos, la combinación puede permitir el ahorro de dosis, por ejemplo, las dosis efectivas de los componentes individuales cuando se administran conjuntamente pueden ser menores que las dosis efectivas de cada componente individualmente.

En ciertos aspectos, la composición para usar en el control del dolor proporcionada en este documento es al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% más efectiva para controlar el dolor en el sujeto que una cantidad equivalente del antagonista del NGF o el antagonista del TNF α administrados solos. En ciertos aspectos, las dosis del antagonista del NGF o el antagonista del TNF α individuales coadministradas al sujeto o la dosis de la dosis relativa del antagonista del NGF o el antagonista del TNF α proporcionado tras la administración de un polipéptido bifuncional proporcionado en el presente documento puede ser menores, por ejemplo, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% más bajas que las dosis necesarias para los componentes administrados solos.

La eficacia del control del dolor puede medirse pidiéndole a un paciente que califique la calidad e intensidad del dolor experimentado de acuerdo con varias escalas diferentes. Una escala de dolor verbal usa palabras para describir un intervalo desde sin dolor, dolor leve, dolor moderado y dolor severo con un puntaje de 0-3 asignado a cada uno. Alternativamente, se le puede pedir a un paciente que califique su dolor de acuerdo con una escala numérica de dolor de 0 (sin dolor) a 10 (peor dolor posible). En una escala analógica visual (VAS), una línea vertical u horizontal tiene palabras para describir el dolor desde el no dolor hasta el peor dolor posible y se le pide al paciente que marque la línea en el punto que representa su nivel actual de dolor. El índice de dolor de McGill permite a los pacientes describir tanto la calidad como la intensidad del dolor seleccionando las palabras que mejor describen su dolor de una serie de listas cortas, por ejemplo, golpes, ardor, pellizcos. Se pueden usar otras escalas de dolor para adultos que experimentan dificultades para usar VAS o escalas numéricas, por ejemplo, FACES o para pacientes no verbales, por ejemplo, escala de calificación de comportamiento. El puntaje de actividad funcional relata cuán impedido está un paciente por su dolor al pedirle que realice una tarea relacionada con el área dolorosa. Las mejoras en la puntuación del dolor utilizando estos tipos de escala podrían indicar potencialmente una mejora en la eficacia de un analgésico.

De acuerdo con la composición para usar en el control del dolor proporcionada en este documento, la administración de la composición es suficiente para controlar el dolor en un sujeto que necesita control del dolor, por ejemplo, la coadministración de un antagonista del NGF y un antagonista del TNF α , o la administración de un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica que comprende un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α puede prevenir, reducir, mejorar o eliminar el dolor en el sujeto. En ciertos aspectos, el dolor puede ser agudo, dolor a corto plazo, dolor nociceptivo persistente o crónico o dolor neuropático persistente o crónico.

En ciertos aspectos, las formulaciones se preparan para almacenamiento y uso combinando de un polipéptido multifuncional antagonista del TNF α y NGF, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica como se proporciona en el presente documento o una combinación de un antagonista del TNF α y un antagonista del NGF como se proporciona en el presente documento, con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, portador, excipiente) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20a Edición Mack Publishing, 2000). Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, tampones no tóxicos tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; carbohidratos tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn proteína); y tensioactivos no iónicos tales como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

Los polipéptidos multifuncionales de la presente divulgación pueden formularse en formas líquidas, semisólidas o sólidas dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la molécula y la ruta de suministro. Las formulaciones pueden incluir excipientes, o combinaciones de excipientes, por ejemplo: azúcares, aminoácidos y tensioactivos. Las

formulaciones líquidas pueden incluir una amplia gama de concentraciones de polipéptidos y pH. Las formulaciones sólidas pueden producirse mediante liofilización, secado por aspersión o secado mediante tecnología de fluido supercrítico, por ejemplo. En algunas realizaciones, cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento es una formulación liofilizada.

- 5 En una realización específica, se formula un polipéptido multifuncional de la divulgación en fosfato de sodio 20 mM, L-arginina-HCL 50 mM, sacarosa 150 mM, polisorbato 80 al 0,03% (p/v), pH 6,5.

Una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento se puede administrar de varias maneras para tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (tal como a las membranas mucosas, incluida administración vaginal y rectal) tal como parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos; pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluso por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica); oral; o parenteral incluyendo inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

- 15 Un polipéptido multifuncional antagonista del TNF α y NGF como se proporciona en el presente documento o una combinación de un antagonista del TNF α y un antagonista del NGF como se proporciona en el presente documento pueden combinarse adicionalmente en una formulación de combinación farmacéutica, o régimen de dosificación como terapia de combinación, con un segundo (o tercer) compuesto que tiene propiedades antinociceptivas.

Para el tratamiento del dolor, la dosis apropiada de un polipéptido multifuncional antagonista del TNF α y NGF, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica como se proporciona en el presente documento o una combinación de un antagonista del TNF α y un antagonista del NGF como se proporciona en el presente documento depende del tipo de dolor a tratar, la gravedad y el curso del dolor, la capacidad de respuesta del dolor, ya sea que el polipéptido multifuncional o la combinación de polipéptidos se administren con fines terapéuticos o profilácticos, terapia previa, historial clínico del paciente, etc., a discreción del médico tratante. La combinación de polipéptido o polipéptido multifuncional se puede administrar una vez o durante una serie de tratamientos que duran desde varios días hasta varios meses para mantener un control eficaz del dolor. Los horarios de dosificación óptimos se pueden calcular a partir de mediciones de acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo o polipéptido individual. El médico administrador puede determinar fácilmente las dosis óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición.

La administración de un polipéptido multifuncional, por ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, o una terapia de combinación de polipéptidos como se proporciona en el presente documento puede proporcionar "sinergia" y demostrar "sinergia", es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos usados juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso de los compuestos por separado. Se puede lograr un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos son: (1) administrados como un único polipéptido de fusión multifuncional; (2) coformulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosis unitaria combinada; (3) suministrado en forma alternada o en paralelo como formulaciones separadas; o (4) por algún otro régimen. Cuando se administra en terapia de alternación, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, se administra secuencialmente una dosis efectiva de cada ingrediente activo, mientras que en la terapia de combinación, las dosis efectivas de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

40 Dolor

En su uso más amplio, "dolor" se refiere a un fenómeno experiencial que es altamente subjetivo para el individuo que lo experimenta, y está influenciado por el estado mental del individuo, incluido el entorno y los antecedentes culturales. El dolor "físico" generalmente puede estar relacionado con un estímulo perceptible a un tercero que es causante de daño tisular real o potencial. En este sentido, el dolor puede considerarse como una "experiencia sensorial y emocional asociada con daño tisular real o potencial, o descrita en términos de dicho daño", de acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP). Sin embargo, algunos casos de dolor no tienen una causa perceptible. Por ejemplo, el dolor psicógeno, incluida la exacerbación de un dolor físico preexistente por factores psicógenos o síndromes de un dolor percibido a veces persistente en personas con trastornos psicológicos sin ninguna evidencia de una causa perceptible de dolor.

50 Tipos de dolor

El dolor incluye dolor nociceptivo, dolor neuropático/neurogénico, dolor irruptivo, alodinia, hiperalgesia, hiperestesia, disestesia, parestesia, hiperpatía, dolor de miembro fantasma, dolor psicógeno, anestesia dolorosa, neuralgia, neuritis. Otras categorizaciones incluyen dolor maligno, dolor anginoso y/o dolor idiopático, síndrome de dolor regional complejo I, síndrome de dolor regional complejo II. Los tipos y síntomas de dolor no necesitan ser mutuamente excluyentes. Estos términos tienen la intención definida por la IASP.

El dolor nociceptivo es iniciado por nociceptores sensoriales especializados en los nervios periféricos en respuesta a estímulos nocivos, que codifican estímulos nocivos en potenciales de acción. Los nociceptores, generalmente en fibras A δ y fibras C (polimodales), son terminaciones nerviosas libres que terminan justo debajo de la piel, en tendones,

articulaciones y órganos del cuerpo. Las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) proporcionan un sitio de comunicación entre la periferia y la médula espinal. La señal se procesa a través de la médula espinal hacia el tronco encefálico y los sitios talámicos y finalmente hacia la corteza cerebral, donde generalmente (pero no siempre) provoca una sensación de dolor. El dolor nociceptivo puede ser el resultado de una amplia variedad de eventos químicos, 5 térmicos, biológicos (por ejemplo, inflamatorios) o mecánicos que tienen el potencial de irritar o dañar el tejido corporal, que generalmente están por encima de un cierto umbral mínimo de intensidad requerido para causar actividad nociceptiva en los nociceptores

El dolor neuropático es generalmente el resultado de un funcionamiento anormal en el sistema nervioso periférico o central, dando lugar a dolor neuropático periférico o central, respectivamente. El dolor neuropático se define por la 10 IASP como el dolor iniciado o causado por una lesión primaria o disfunción en el sistema nervioso. El dolor neuropático a menudo implica un daño real al sistema nervioso, especialmente en casos crónicos. El dolor nociceptivo inflamatorio generalmente es el resultado del daño tisular y el proceso inflamatorio resultante. El dolor neuropático puede persistir mucho después (por ejemplo, meses o años) más allá de la curación aparente de cualquier daño observable en los tejidos.

En casos de dolor neuropático, el procesamiento sensorial de una región afectada puede convertirse en estímulos anormales e ino cuos (por ejemplo, térmicos, táctiles/presión) que normalmente no causarían dolor (por ejemplo, 15 alodinia) o estímulos nocivos pueden provocar percepciones exageradas de dolor (es decir, hiperalgesia) en respuesta a un estímulo normalmente doloroso. Además, las sensaciones similares a hormigueo eléctrico o golpes o "alfileres y agujas" (es decir, parestesias) y/o sensaciones que tienen cualidades desagradables (es decir, disestesias) pueden 20 ser provocadas por estímulos normales. El dolor irruptivo es un agravamiento del dolor crónico preexistente. La hiperpatía es un síndrome doloroso que resulta de una reacción anormalmente dolorosa a un estímulo. El estímulo en la mayoría de los casos es repetitivo con un umbral de dolor aumentado, que puede considerarse como la menor experiencia de dolor que un paciente puede reconocer como dolor.

Los ejemplos de dolor neuropático incluyen alodinia táctil (por ejemplo, inducida después de una lesión nerviosa), 25 neuralgia (por ejemplo, neuralgia post herpética (o posterior a la culebrilla), neuralgia del trigémino), distrofia/causalgia simpática refleja (trauma nervioso), componentes del dolor por cáncer (por ejemplo, dolor debido al cáncer en sí mismo o afecciones asociadas, tales como inflamación, o debido a un tratamiento como quimioterapia, cirugía o radioterapia), dolor de miembro fantasma, neuropatía por atrapamiento (por ejemplo, síndrome del túnel carpiano) y neuropatías tales como neuropatía periférica (por ejemplo, debido a diabetes, VIH, consumo crónico de alcohol, exposición a otras 30 toxinas (incluidas muchas quimioterapias), deficiencias vitamínicas y una gran variedad de otras afecciones médicas). El dolor neuropático incluye el dolor inducido por la expresión de la operación patológica del sistema nervioso después de una lesión nerviosa debido a varias causas, por ejemplo, operación quirúrgica, herida, herpes zóster, neuropatía diabética, amputación de piernas o brazos o cáncer. Las condiciones médicas asociadas con el dolor neuropático incluyen lesión nerviosa traumática, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, siringomielia, lesión de la médula 35 espinal y cáncer.

Un estímulo que causa dolor a menudo evoca una respuesta inflamatoria que puede contribuir a una experiencia de dolor. En algunas condiciones, el dolor parece ser causado por una mezcla compleja de factores nociceptivos y neuropáticos. Por ejemplo, el dolor crónico a menudo comprende dolor inflamatorio nociceptivo o dolor neuropático, o 40 una mezcla de ambos. Una disfunción o lesión inicial del sistema nervioso puede desencadenar la liberación neural de mediadores inflamatorios y la posterior inflamación neuropática. Por ejemplo, las migrañas pueden representar una mezcla de dolor neuropático y nociceptivo. Además, el dolor miofascial es probablemente secundario al aporte nociceptivo de los músculos, pero la actividad muscular anormal puede ser el resultado de afecciones neuropáticas.

Kits que comprenden antagonistas del TNF α y del NGF

Esta divulgación proporciona kits que comprenden un polipéptido multifuncional antagonista del TNF α y NGF, por 45 ejemplo, una molécula de unión multiespecífica, como se proporciona en el presente documento o una combinación de un antagonista del TNF α y un antagonista del NGF como se proporciona en el presente documento, que se puede usar para las composiciones para el uso descrito en el presente documento. En ciertos aspectos, un kit comprende al menos un polipéptido de fusión multifuncional que comprende un antagonista del TNF α y un antagonista del NGF, por 50 ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o 17, en uno o más contenedores, o una combinación de un antagonista del NGF, por ejemplo, MEDI-578, y un antagonista del TNF α , por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF α tal como infliximab o adalimumab, o un fragmento soluble de unión a TNF α de un receptor del TNF, por ejemplo, TNFR2-Fc. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que los antagonistas del TNF α y del NGF divulgados proporcionados en el presente documento se pueden incorporar fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos, que son bien conocidos en la técnica.

55 Ejemplos

La divulgación que ahora se describirá en general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines ilustrativos de ciertos aspectos y realizaciones de la presente divulgación, y no están destinados a limitar la divulgación.

Ejemplo 1 - Construcción y caracterización de una molécula de unión multispecífica anti NGF scFv/TNFR2-Fc

Una molécula multifuncional, específicamente, una molécula de unión multispecífica que comprende un dominio de anticuerpo anti NGF y un dominio TNFR2-Fc se produjo como sigue. El fragmento scFv del anticuerpo anti-NGF se fusionó con el extremo terminal C de una proteína de fusión TNFR2-Fc (SEQ ID NO: 13) a través del dominio CH3 de cadena pesada, de acuerdo con el formato Bs3Ab descrito en Dimasi, N., et al. J Mol Biol. 393: 672-92 (2009), y en la publicación PCT No. WO 2013/070565. Un diagrama de la estructura se muestra en la Figura 1. Los constructos de ADN que codifican el polipéptido TNFR2-Fc y la molécula de unión multispecífica fueron sintetizados por GeneArt (Invitrogen). Para la molécula de unión multispecífica, se construyó un scFv anti-NGF que comprende los dominios VH (SEQ ID NO: 3) y VL (SEQ ID NO: 7) de MEDI-578 unidos a través de una secuencia enlazadora de 15 aminoácidos (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 15). El extremo terminal N del scFv se fusionó, a través de una secuencia enlazadora de 10 aminoácidos (GGGGS)₂, con el extremo terminal C de la SEQ ID NO: 13. Esta molécula de unión multispecífica se denomina en el presente documento TNFR2-Fc_VH#4. El constructo de ADN que codifica la molécula de unión multispecífica se manipuló para contener un codón de parada y un sitio de restricción EcoRI en el extremo 3' para clonarlo en el vector de expresión Bs3Ab. La secuencia de ADN que codifica TNFR2-Fc_VH#4 se presenta como la SEQ ID NO: 16 y su secuencia de aminoácidos como la SEQ ID NO: 14.

La termoestabilidad de la molécula de unión multispecífica TNF-NGF se mejoró mediante la adición de un enlace disulfuro entre cadenas entre los dominios VH y VL de la porción scFv MEDI-578 de la molécula de unión multispecífica. Esto se realizó mediante la introducción de una mutación G-> C en el aminoácido 44 del dominio VH (SEQ ID NO: 94) y en el aminoácido 102 del dominio VL (SEQ ID NO: 95). Este clon se designó TNFR2-Fc_varB. La secuencia de aminoácidos de TNFR2-Fc_varB se presenta como la SEQ ID NO: 17. Una secuencia de ADN que codifica TNFR2-Fc_varB se presenta como la SEQ ID NO: 18. Una secuencia de ADN optimizada por codón que codifica TNFR2-Fc_varB se presenta en la SEQ ID NO: 99. TNFR2-Fc_varB se diferencia además de TNFR2-Fc_VH#4 en que la secuencia enlazadora de 15 aminoácidos (GGGGS)₃ que se une el VH y VL de la porción de scFv se reemplaza con un enlazador de 20 aminoácidos (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19). Se usó fluorometría diferencial de barrido (DSF) para medir la T_m de TNFR2-Fc_VH#4 y TNFR2-Fc_varB. Este método mide la incorporación de un colorante fluorescente, Sypro Orange (Invitrogen), que se une a las superficies hidrofóbicas reveladas durante el despliegue del dominio de la proteína tras la exposición a temperaturas elevadas. En el ensayo DSF, la T_m de TNFR2-Fc_VH#4 fue de 62 °C, mientras que la T_m de TNFR2-Fc_varB fue de 66 °C. Por lo tanto, la adición del enlace disulfuro entre cadenas en la porción scFv de MEDI-578 de la molécula multispecífica mejoró la termoestabilidad de la molécula en 4 °C.

La proteína TNFR2-Fc y TNFR2-Fc_VH#4 se expresaron transitoriamente en células CHO en suspensión usando polietilenimina (PEI) (Polysciences) como el reactivo de transfección. Las células se mantuvieron en medio CD-CHO (Life Technologies). Las recolecciones de cultivos de transfecciones a pequeña escala se purificaron usando cromatografía de afinidad HiTrap MabSelect SuRe^{MR} de 1 mL de acuerdo con el protocolo del fabricante (GE Healthcare) y posteriormente se intercambiaron con tampón en sacarosa al 1%, NaCl 100 mM, clorhidrato de L-arginina 25 mM y fosfato de sodio 25 mM (pH 6,3). La pureza de las proteínas recombinantes se analizó usando SDS-PAGE en condiciones reductoras y usando cromatografía analítica de exclusión por tamaño (véase el método a continuación), y se determinaron las concentraciones leyendo la absorbancia a 280 nm usando coeficientes de extinción determinados teóricamente.

La expresión transitoria a pequeña escala y la purificación en columna de proteína A de la proteína de fusión TNFR2-Fc y el constructo multispecífico TNF-NGF, TNFR2-Fc_VH#4, produjeron rendimientos de 36,6 y 79,9 mgL⁻¹ respectivamente.

Se produjo un lote más grande de TNFR2-Fc_VH#4 de la siguiente manera. Una recolección de cultivo crudo de una transfección a gran escala (hasta 6 litros) se filtró usando filtración profunda y se cargó en una columna de agarosa Proteína A de 1,6 x 20 cm (GE Healthcare) equilibrada previamente con tampón A (solución salina tamponada con fosfato pH 7,2). Luego se lavó la columna con tampón A y el producto se eluyó en un gradiente por etapas de tampón B (acetato de sodio 50 mM pH <4,0). El producto se purificó adicionalmente mediante carga en una columna Poros HS 50 de 1,6 x 20 cm (Applied Biosystems) equilibrada previamente en tampón C (tampón de acetato de sodio 50 mM pH <5,5), se lavó en tampón C y luego el producto se eluyó en un gradiente lineal de NaCl 0 a 1 M en tampón de acetato de sodio 50 mM pH <5,5. Los eluatos resultantes se analizaron por HPLC de exclusión por tamaño. La concentración de proteína se determinó mediante espectroscopía A₂₈₀ con un espectrofotómetro Beckman DU520 usando un coeficiente de extinción calculado de 1,36.

Métodos para la caracterización de TNFR2-Fc_VH#4

El análisis de transferencia Western se llevó a cabo usando protocolos estándar. Las proteínas se transfirieron a la membrana de fluoruro de polivinilideno (Life Technologies) usando el sistema Xcell SureLock^{MR} (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La membrana se bloqueó con leche descremada en polvo al 3% (p/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las transferencias Western se desarrollaron usando protocolos estándar con anticuerpo específico de Fc anti-IgG humano conjugado con HRP (Sigma).

La HPLC de exclusión por tamaño se realizó usando un sistema de HPLC Gilson (bomba isocrática-307, detector UV/Vis-151, manipulador de líquidos 215 y un módulo de inyección 819) con una columna Phenomenex BioSep-SEC-S3000 (300 x 7,8 mm) con una fase móvil de D-PBS (Life Technologies) a un caudal de 1 mL/min. Se inyectaron muestras de 25 µL en la columna y se monitorizó la separación de las especies de proteínas a A280 nm.

La desglicosilación enzimática del TNFR2-Fc_VH#4 purificado a pequeña escala se realizó usando un kit EDGLY (Sigma Aldrich) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las proteínas fueron desglicosiladas tanto en condiciones desnaturalizadas como nativas. Para las proteínas desnaturalizadas, 30 µg de proteína fueron desglicosilados con PNGasa F, O-glucosidasa y α -(2 → 3, 6, 8, 9)-neuraminidasa, β -N-acetilglucosaminidasa y P-(1 → 4)-galactosidasa durante 3 h a 37 °C. En condiciones nativas, 35 µg de proteína fueron desglicosilados con el mismo conjunto de enzimas anterior durante 3 días a 37 °C. Las proteínas desglicosiladas se analizaron mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie y mediante transferencia Western utilizando protocolos de ensayo estándar.

La secuenciación de aminoácidos del extremo terminal N de TNFR2-Fc_VH#4 se realizó de la siguiente manera. Aproximadamente 2 µg de TNFR2-Fc_VH#4 se corrieron en un gel SDS-PAGE usando protocolos estándar. Las proteínas se transfirieron a la membrana de PVDF utilizando el sistema Xcell SureLock^{MR} (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La membrana se tiñó con Amido Black al 0,1% (p/v) durante aproximadamente 15 minutos en una plataforma de agitación orbital y luego se lavó con dH₂O para reducir la tinción de fondo de la membrana de PVDF. La membrana se secó al aire antes de la secuenciación del extremo terminal N. Se cortaron las bandas de interés y se realizó la determinación de la secuencia del extremo terminal N de la molécula de unión multiespecífica en un secuenciador 494 HT de Applied Biosystems (Applied Biosystems, San Francisco, CA, EE. UU.) con análisis de feniltiohidantoína en línea usando un micro HPLC Applied Biosystems 140A.

Resultados de la caracterización

Las proteínas TNFR2-Fc_VH#4 y TNFR2-Fc purificadas se perfilaron mediante SEC-HPLC para niveles de fragmentación de agregados, monómeros y proteínas (Figuras 2A y 2B). El pico principal que comprende el monómero constituía aproximadamente el 90% de la proteína total presente con el restante aproximadamente 10% de la masa de proteína con un menor tiempo de retención de columna que indica la presencia de especies o agregados de orden superior. Sin embargo, el pico del monómero de la SEC-HPLC tenía dos hombros pronunciados que indicaban que la proteína dentro de este pico no era una sola especie. El análisis SDS-PAGE con tinción de Coomassie mostró dos bandas distintas para TNFR2-Fc_VH#4 (a aproximadamente 100 y 75 kD) y de manera similar dos bandas distintas para la proteína de fusión TNFR2-Fc también (a aproximadamente 70 y 45 kD) bajo condiciones reductoras (Figura 2B). En condiciones no reductoras, tres bandas principales estaban presentes para TNFR2-Fc_VH#4 (entre 150 y 250 kD) y una banda principal y una banda menor para la proteína de fusión TNFR2-Fc a aproximadamente 150 y 120 kD respectivamente. Dado que la diferencia de masa molecular entre las dos bandas en condiciones reductoras era aproximadamente equivalente al tamaño de un fragmento scFv (~26,5 kD) se realizó un análisis adicional para comprender en qué formas se generaba la molécula de unión multiespecífica. El análisis espectroscópico de masas en condiciones nativas confirmó los datos de SDS-PAGE, que para dos preparaciones de proteínas purificadas separadas había tres masas moleculares presentes en la preparación de TNFR2-Fc_VH#4 purificada a aproximadamente 125, 152 y 176 kD (Figura 2C).

Si el patrón de bandas observado por el gel SDS-PAGE se debió a la glicosilación diferencial de TNFR2-Fc_VH#4, entonces, después de la desglicosilación, esto se resolvería nuevamente en una sola banda. Sin embargo, el patrón de bandas se mantuvo tanto en condiciones reductoras como no reductoras cuando TNFR2-Fc_VH#4 se desglicosiló como proteína nativa o como proteína desnaturalizada (datos no mostrados). La tinción de la transferencia Western de TNFR2-Fc_VH#4 glicosilada y desglicosilada con un anticuerpo policlonal específico de Fc anti-IgG humano mostró que tanto la banda esperada de longitud completa como la banda de masa molecular menor eran reactivas con anticuerpos específicos anti-Fc (datos no mostrados).

La identificación final del producto truncado se realizó mediante secuenciación de aminoácidos del extremo terminal N de la proteína. Esto reveló que los primeros 8 aminoácidos del extremo terminal N de la proteína truncada eran SMAPGAVH correspondientes a los aminoácidos 176 a 183 de la secuencia de TNFR2-Fc_VH#4 (SEQ ID NO: 14). Esto representó un truncamiento de 175 aminoácidos en el extremo terminal N de TNFR2-Fc_VH#4, que dejó solo 42 aminoácidos del dominio TNFR2. Esto nos permite interpretar con precisión los datos de masa de SDS-PAGE, espectroscopía de masas y análisis SEC-HPLC. Hubo tres combinaciones posibles de dímeros TNFR2-Fc_VH#4 y todos estaban presentes en las preparaciones de proteínas purificadas: (1) homodímero de longitud completa, (2) un heterodímero de especies de longitud completa y truncadas, y (3) un homodímero de especies truncadas. Para medir con precisión la actividad biológica tanto *in vitro* como *in vivo*, se generó una preparación del homodímero de longitud completa mediante un proceso de cromatografía en columna de dos etapas. En la primera etapa, después de la purificación de la proteína A, el producto contenía 80,5% de monómero (Figura 3A) y después de la segunda etapa de purificación en columna (Sephacrose SP) el porcentaje de monómero fue del 97,8% (Figura 3B). El rendimiento en todo el proceso fue del 7,3%.

Ejemplo 2 - Análisis de estabilidad térmica por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se usó un DSC capilar microCal VP automatizado (GE Healthcare, EE. UU.) para las mediciones calorimétricas. Las muestras de proteínas se analizaron a razón de 1 mg/mL en tampón Histidina/Histidina-HCl 25 mM, pH 6,0. Las muestras de proteína y el tampón se sometieron a una rampa de calor lineal desde 25 °C hasta 100 °C a una velocidad de 95 °C por hora. El tampón se restó como referencia de la muestra de proteína usando el software Origin 7 y se

El termograma para TNFR2-Fc_VH#4 (Figura 4) muestra tres transiciones de despliegue distintas con temperaturas de desnaturalización (T_m) de 64, 67 y 84 °C. Se dedujo que la T_m de 64 °C correspondía a la desnaturalización tanto del dominio TNFR2 como del dominio scFv anti-NGF, siendo las T_m de 67 °C y 84 °C típicas de las T_m de desnaturalización para los dominios CH2 y CH3 de IgG1 respectivamente (por ejemplo, Dimasi, N., et al., J Mol Biol. 393: 672-92 (2009), y la publicación PCT No. WO 2013/070565). Sin querer estar limitados por la teoría, scFv generalmente tiene temperaturas de desnaturalización menores que los otros dominios de anticuerpo, y su despliegue se caracteriza por un solo evento de transición (Roberge et al., 2006, Jung et al., 1999, Tischenko et al., 1998).

Ejemplo 3 - Confirmación de la unión a antígeno con TNFR2-Fc_VH#4

A. Unión a antígeno sencilla y doble mediante ELISA

Los pozos Nunc Maxisorp se revistieron a 4 °C durante la noche con 50 µL de TNFα (R&D Systems) diluidos a 5 µg/mL¹ en PBS (pH 7,4). Al día siguiente, la solución de recubrimiento se retiró y los pozos se bloquearon con 150 µL de tampón de bloqueo [leche desnatada-PBS al 3%] durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos se enjuagaron tres veces en PBS, antes de la adición de 50 µL de una serie de diluciones de TNFR2-Fc_VH#4 preparadas en tampón de bloqueo. Después de 1 h a temperatura ambiente, los pozos se lavaron tres veces en PBS-Tween 20 (0,1% v/v; PBS-T). Luego se añadieron 50 µL del NGF biotinilado a los pozos y se incubaron durante una hora más a temperatura ambiente, antes del lavado como se indicó anteriormente y la adición de 50 µL de estreptavidina-HRP (1:100). Después de 1 hora a temperatura ambiente, los pozos se lavaron con PBS-T, se añadieron 50 µL de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y se permitió que se desarrollara el color. La reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm usando un lector de placa de microtitulación. Los datos resultantes se analizaron utilizando el software Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA). Para el ELISA de unión a antígeno único, los pozos se revistieron con TNFα o NGF-biotina como se indicó anteriormente y se detectó la unión a anticuerpos con anticuerpo conjugado HRP específico de Fc anti-IgG humano (1:5000), y se desarrolló el color como se indicó anteriormente.

Los resultados de ELISA se muestran en la Figura 5. TNFR2-Fc_VH#4 fue diseñado para unirse a los antígenos del TNFα y NGF. La unión de antígeno único se realizó inmovilizando primero un antígeno en una placa de microtitulación de 96 pozos, seguido de la adición de diluciones en serie de TNFR2-Fc_VH#4. La unión específica se detectó usando un anticuerpo específico de Fc anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Para el ELISA de unión a antígeno dual, el primer antígeno, TNFα se inmovilizó en la placa de ELISA, y luego se añadió una dilución en serie de TNFR2-Fc_VH#4, seguido de la adición del segundo antígeno biotinilado, NGF a una concentración fija. Entonces se detectó la unión específica usando una estreptavidina conjugada con HRP. TNFR2-Fc_VH#4 se unió a TNFα y NGF en el ELISA de unión a antígeno único (Figura 5A y B). En el ELISA de unión a antígeno dual, TNFR2-Fc_VH#4 se unió a TNFα y NGF simultáneamente (Figura 5C).

B. Unión simultánea a antígeno mediante resonancia de plasmón superficial

Se llevaron a cabo experimentos simultáneos de unión a antígeno esencialmente como se describe en Dimasi, N. et al., J Mol Biol. 393: 672-92 (2009) utilizando un instrumento BIAcore 2000 (GE Healthcare). En resumen, se usó un chip sensor CM5 para inmovilizar aproximadamente 1500 unidades de resonancia de TNFR2-Fc_VH#4 a 100 nM. Las superficies del chip sensor se usaron luego para la unión concurrente de TNFα y NGF. Los antígenos se prepararon en tampón HBS-EP [HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 3 mM, P20 al 0,005%]. Se usó un caudal de 30 µL/min para todas las mediciones de unión. Para determinar la unión simultánea del anticuerpo multiespecífico a TNFα y NGF, se inyectó 1 µM de TNFα (masa molecular, 17,5 kD) sobre la superficie del chip sensor, y al finalizar la inyección, se inyectó luego una mezcla de TNFα y NGF (masa molecular, 13,5 kD), ambos a 1 µM. Se incluyó TNFα en la mezcla con NGF para evitar la pérdida de señal debido a la disociación de TNFα durante la fase de unión del NGF. Como control, se realizó un procedimiento de unión similar, y en la última inyección solo se añadió TNFα, ningún aumento adicional en las unidades de resonancia para esta inyección indicó que el TNFα estaba unido a niveles saturantes. Se realizaron experimentos de unión y control similares en los que se invirtió el orden de inyección de TNFα y NGF.

La unión antigénica simultánea de TNFR2-Fc_VH#4 se caracterizó por resonancia de plasmón superficial. Los eventos de unión se analizaron cualitativamente de manera secuencial. TNFR2-Fc_VH#4 se inmovilizó covalentemente en la superficie del chip sensor usando química de acoplamiento de amina. Posteriormente, se inyectó el primer antígeno para dar niveles saturantes de unión a TNFR2-Fc_VH#4, luego se inyectó el segundo antígeno como una mezcla equimolar con el antígeno 1. El diagrama de detección de unión mostró claramente que TNFR2-Fc_VH#4 se unió simultáneamente a TNFα y NGF (Figura 6). La unión simultánea de los dos antígenos se produjo independientemente del orden de inyección del antígeno.

Ejemplo 4 - Inhibición de la proliferación celular TF-1 inducida por NGF

Se sembraron células TF-1 (ECACC catálogo No. 93022307) a razón de $1,5 \times 10^4$ células/pozo en 50 μ L de medio de cultivo libre de suero en una placa de cultivo de tejidos de 96 pozos (Corning Costar) y se incubaron durante 18 h a 37 °C con 5% de CO₂. Se incubaron previamente NGF recombinante humanos (Sigma) o de ratón (R&D Systems) con diluciones de TNFR2-Fc_VH#4, MEDI-578 IgG1 TM YTE, un control de isotipo IgG1 TM YTE sin unión para MEDI-578, o un control de isotipo biespecífico sin unión Bs3Ab R347 durante 30 minutos a 37 °C en una placa de fondo redondo de 96 pozos (Greiner). Luego se añadieron 50 μ L de cada muestra a la placa de células y se incubó durante 48 h a 37 °C. Después del período de incubación, se añadieron 100 μ L de tampón de ensayo celular TITRE GLO® (Promega) y la placa se incubó durante 10 minutos a 37 °C con 5% de CO₂. Luego se midió la luminiscencia usando el protocolo de luminiscencia estándar. La proliferación de TF-1 inducida por NGF estándar en ausencia de anticuerpo se muestra en la Figura 7A.

La actividad funcional de TNFR2-Fc_VH#4 se determinó usando proliferación de TF-1 inducida por NGF. TNFR2-Fc_VH#4 fue capaz de inhibir completamente la proliferación inducida por NGF humano y murino (Figura 7B y 7C, respectivamente). Figura 7B: las células TF-1 se estimularon con NGF humano recombinante correspondiente a la concentración EC₈₀. Las células se incubaron con ligando con una serie de anticuerpos de dilución durante 48 horas, después de lo cual se cuantificó la proliferación celular por cultivo durante 10 minutos con tampón de ensayo celular TITRE GLO® (Promega). Figura 7C: las células TF-1 se estimularon con NGF murino recombinante correspondiente a la concentración EC₈₀. Las células se incubaron con ligando con una serie de anticuerpos de dilución durante 48 horas, después de lo cual se cuantificó la proliferación celular por cultivo durante 10 minutos con tampón de ensayo celular TITRE GLO® (Promega). Estos datos demuestran que la porción inhibidora del NGF de TNFR2-Fc_VH#4 es biológicamente activa e inhibe la proliferación inducida por NGF con una potencia similar a MEDI-578 como en IgG1TM. También se observaron datos similares para TNFR2-Fc_varB y otra molécula de unión multiespecífica TNF-NGF ndimab varB (Figuras 7D y 7E). ndimab varB comprende un anticuerpo anti-TNF α completo, es decir, un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas en un formato H₂L₂, con scFv MEDI-578 fusionado al extremo terminal C de la cadena pesada del anticuerpo anti-TNF α . La cadena ligera de ndimab varB se representa en la SEQ ID NO: 20 y la cadena pesada de ndimab varB se representa en la SEQ ID NO: 22.

Ejemplo 5 - Inhibición de apoptosis de células U937 inducida por TNF α

Las células U937 (ECACC Cat. No. 85011440) se sembraron en una placa de cultivo de tejidos de 96 pozos de pared negra (Corning Costar) a una concentración de 8×10^5 células/pozo en 50 μ L de medio de cultivo. Las células U937 se estimularon con TNF α humano recombinante correspondiente a la concentración EC₈₀. Las células se incubaron con ligando con una serie de anticuerpos de dilución durante 2 horas, después de lo cual la actividad de la caspasa 3 se cuantificó por cultivo durante 2 horas con tampón de reacción del ensayo de Caspasa 3. TNFR2-Fc_VH#4, un control de isotipo biespecífico sin unión, Bs3Ab R347 y etanercept se incubaron previamente con las células durante 30 minutos a 37 °C. Esto fue seguido por la adición de 50 μ L de TNF α humano recombinante (R&D Systems) para obtener una concentración de ensayo final de 20 ng/mL y una incubación posterior de 2 h a 37 °C. Después del período de incubación, se añadieron 50 μ L de tampón de reacción de ensayo de Caspasa 3 (CHAPS al 0,2% p/v, Igepal CA-630 al 0,5% v/v, NaCl 200 mM, HEPES 50 mM, sustrato DEVD-R110 20 μ M (Invitrogen)) y las células se incubaron durante 2,5 h a 37 °C. La fluorescencia se midió por excitación a 475 nm y emisión a 512 nm. La actividad de Caspasa en ausencia de un antagonista del TNF α se muestra en la Figura 8A.

La actividad funcional de TNFR2-Fc_VH#4 se determinó usando un ensayo de actividad de Caspasa 3 inducida por TNF α en células U937. TNFR2-Fc_VH#4 inhibió completamente la actividad de Caspasa 3 inducida por TNF α como lo hizo etanercept (Figura 8B). Esto ilustra claramente que la porción inhibidora de TNF α de TNFR2-Fc_VH#4 es biológicamente activa y tiene una potencia similar a etanercept. También se observaron datos similares para TNFR2-Fc_varB y ndimab varB (véase la Figura 8C).

Ejemplo 6 - Ensayos *in vivo*

Todos los procedimientos *in vivo* se llevaron a cabo de acuerdo con la Ley sobre Animales del Ministerio del Interior del Reino Unido (Procedimientos Científicos) (1986) y aprobados por un comité de ética local. Se utilizaron ratones C57B1/6 hembra (Charles River, Reino Unido) en todo momento. Los ratones se alojaron en grupos de 5/6 por jaula, en jaulas ventiladas individualmente (IVC) con libre acceso a alimentos y agua en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas de 07:00 a 19:00). Las salas de alojamiento y de procedimientos se mantuvieron a 24 °C y el ruido de fondo constante se mantuvo a través de una estación de radio convencional. Todos los ratones se sometieron a la inserción de transpondedores bajo anestesia (3% de isoflurano en oxígeno) con fines de identificación al menos 5 días antes del inicio de cada estudio.

A. Modelo de Seltzer de dolor neuropático

La hiperalgesia mecánica se determinó usando un medidor de analgesia (Randall LO, Selitto JJ, Arch Int Pharmacodyn Ther. 111: 409-19 (1957)) (Ugo Basile). Se aplicó una fuerza creciente a la superficie dorsal de cada pata trasera a su vez hasta que se observó una respuesta de retirada. La aplicación de la fuerza se detuvo en este punto y se registró el peso en gramos. Los datos se expresaron como umbral de retirada en gramos para patas ipsilaterales y contralaterales. Después del establecimiento de las lecturas de referencia, los ratones se dividieron en 2 grupos con

proporciones ipsilaterales/contralaterales aproximadamente iguales y se sometieron a cirugía. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano al 3%. Después de esto, aproximadamente 1 cm del nervio ciático izquierdo fue expuesto por disección roma a través de una incisión a la altura de la mitad del muslo. Luego se pasó una sutura (10/0 Virgin Silk: Ethicon) a través del tercio dorsal del nervio y se ató firmemente. La incisión se cerró con pegamento y se permitió que los ratones se recuperaran durante al menos siete días antes del comienzo de la prueba. Los ratones operados de forma simulada se sometieron al mismo protocolo, pero después de la exposición del nervio, la herida se pegó y se dejó recuperar. Los ratones fueron evaluados para detectar hiperalgesia los días 7 y 10 después de la cirugía. Después de la prueba el día 10, los ratones operados se subdividieron en grupos que recibieron control de isotipo CAT251 IgG1 (0,03 mg/kg sc), etanercept (0,01 mg/kg sc), MEDI-578 (0,03 mg/kg sc) o una combinación de etanercept (0,01 mg/kg sc) y MEDI-578 (0,03 mg/kg sc). Todos los ratones operados en forma simulada recibieron CAT251 (0,03 mg/kg sc). La hiperalgesia mecánica se midió a las 4 h, 1, 2, 3, 4 y 7 días después de la dosis.

La coadministración de etanercept y MEDI-578 en un modelo de hiperalgesia mecánica se manifestó como una reducción significativa en la relación ipsilateral/contralateral en el día 10 después de la cirugía en comparación con los controles operados en forma simulada (Figura 9). La administración de una dosis única de etanercept (0,01 mg/kg sc) o MEDI-578 (0,03 mg/kg sc) no logró revertir significativamente esta hiperalgesia. La coadministración de etanercept (0,01 mg/kg sc) junto con MEDI-578 (0,03 mg/kg s.c.) revirtió significativamente la hiperalgesia mecánica a las 4 h después de la dosis y el efecto se mantuvo hasta 7 días después de la dosis.

En un segundo estudio se evaluó el efecto de TNFR2-Fc_VH#4. Después del establecimiento de una hiperalgesia mecánica, los ratones fueron dosificados el día 13 después de la cirugía con control de isotipo Bs3Ab R347 (0,03 mg/kg sc), etanercept (0,01 mg/kg sc), MEDI-578 (0,03 mg/kg sc) o TNFR2-Fc_VH#4 (0,01 mg/kg o 0,03 mg/kg sc). Los animales preparados en forma simulada recibieron control de isotipo Bs3Ab R347 (0,03 mg/kg sc). Los ratones se analizaron para detectar hiperalgesia mecánica a las 4 h después de la dosis y en los días 1, 2, 4 y 7 después de la dosis como se describió anteriormente.

La administración de TNFR2-Fc_VH#4 produjo una reducción significativa en la relación ipsilateral/contralateral en el día 10 después de la cirugía en comparación con los controles operados en forma simulada (Figura 10A). La administración de etanercept (0,01 mg/kg sc) o MEDI-578 (0,03 mg/kg sc) no logró revertir significativamente la hiperalgesia mecánica. Sin embargo, la administración de TNFR2-Fc_VH#4 (0,01 y 0,03 mg/kg sc) produjo una reversión significativa de la hiperalgesia mecánica a las 4 h después de la dosis, un efecto que se mantuvo hasta 6 días después de la dosis. No se observó ningún efecto después de la administración de Bs3Ab R347 de control. Se observaron datos similares cuando se administró TNFR2-Fc_varB (véase la Figura 10B). Estos datos sugieren que TNFR2-Fc_VH#4 puede revertir significativamente el dolor a dosis muy bajas en las que se ha demostrado que dosis equivalentes son ineficaces o mínimamente efectivas con MEDI-578 o etanercept solos.

B. Modelo de dolor articular crónico

La hipersensibilidad mecánica se determinó usando un probador de incapacidad para ratones (Linton Instrumentation). Los ratones se colocaron en el dispositivo con sus patas traseras en sensores separados, y la distribución del peso corporal se calculó durante un período de 4 s. Los datos se expresaron como la proporción de peso ipsilateral y contralateral en gramos.

Después del establecimiento de lecturas de referencia, los ratones se dividieron en 2 grupos con proporciones ipsilaterales/contralaterales aproximadamente iguales. Las inyecciones intraarticulares se llevaron a cabo utilizando la siguiente técnica: los animales se anestesiaron con isoflurano al 3% en oxígeno y se afeitó y limpió la rodilla izquierda. La articulación de la rodilla de cada ratón se inyectó con 10 µL de adyuvante completo de Freund (FCA) (10 mg/mL) o vehículo (aceite mineral ligero) usando una aguja de calibre 25 montada en una jeringa Hamilton de 100 µL. Las inyecciones se realizaron directamente en el espacio sinovial de la articulación de la rodilla. Se permitió que los ratones se recuperaran y se volvieron a analizar para detectar cambios en la hipersensibilidad mecánica los días 7 y 10 después de la inyección como se describió anteriormente. Después de las pruebas el día 10, los ratones tratados con FCA se distribuyeron aleatoriamente en grupos y en el día 13 los ratones recibieron dosis de etanercept (0,01 mg/kg ip) o vehículo, después de lo cual recibieron una dosis de MEDI-578 (0,03 mg/kg iv) o control de isotipo CAT251 (0,03 mg/kg iv). Se evaluó la hipersensibilidad mecánica de los ratones a las 4 h después de la dosis y en los días 1, 2, 4 y 7 después de la dosis como se describió anteriormente.

El efecto de la coadministración de etanercept y MEDI-578 se evaluó utilizando el modelo intraarticular FCA de dolor inflamatorio. La administración intraarticular de FCA causó una hipersensibilidad mecánica que se manifestó como una reducción significativa en la relación ipsilateral/contralateral en los días 7 y 10 en comparación con el control con vehículo (Figura 11). No se observó reducción en la relación ipsilateral/contralateral en los grupos tratados simulados en comparación con los niveles basales previos al tratamiento. La administración de etanercept (0,01 mg/kg ip) + CAT251 (0,03 mg/kg iv) o PBS (10 mL/kg ip) + MEDI-578 (0,03 mg/kg iv) causó una ligera reversión de la hipersensibilidad mecánica inducida por FCA a las 4 h y los días 1, 2, 4 y 7 después de la dosis, pero esto no logró alcanzar significancia estadística. Sin embargo, la administración de etanercept (0,01 mg/kg ip) + MEDI-578 (0,03 mg/kg iv) causó una reversión significativa de la hipersensibilidad mecánica inducida por FCA en todo momento de la prueba después de la dosis.

En un segundo estudio, se evaluó el efecto de TNFR2-Fc_VH#4. Después del establecimiento de la hipersensibilidad mecánica inducida por FCA, los ratones fueron dosificados en el día 13 posterior a FCA con: control de isotipo Bs3Ab R347 (0,01 mg/kg sc), etanercept (0,01 mg/kg sc), MEDI-578 (0,01 mg/kg sc) o TNFR2-Fc_VH#4 (0,003 mg/kg o 0,01 mg/kg sc). Nuevamente, los ratones se probaron para detectar hipersensibilidad mecánica a las 4 h después de la dosis y en los días 1, 2, 4 y 7 después de la dosis como se describió anteriormente.

El efecto de TNFR2-Fc_VH#4 ("bienespecífico") en comparación con los efectos de etanercept y MEDI-578 individualmente se muestra en la Figura 12. Ni etanercept (0,01 mg/kg sc) ni MEDI-578 (0,01 mg/kg sc) revirtieron significativamente la hipersensibilidad mecánica inducida por FCA en cualquier momento después de la dosis. Sin embargo, la administración de TNFR2-Fc_VH#4 causó una reversión significativa de la hipersensibilidad mecánica inducida por FCA. La dosis más alta de TNFR2-Fc_VH#4 (0,01 mg/kg sc) mostró actividad significativa durante la duración del estudio, mientras que la dosis más baja (0,003 mg/kg sc) alcanzó significancia el día 1 después de la dosis y se mantuvo en un nivel similar a la dosis más alta durante la duración del estudio.

C. Modelo establecido inducido por FCA de hipersensibilidad mecánica en la rata

La inyección intraplantar de adyuvante completo de Freund (FCA) provoca una reacción inflamatoria, que induce hipersensibilidad y edema, e imita algunos aspectos del dolor inflamatorio clínico. Estos efectos pueden investigarse utilizando equipos para medir la carga de peso. Evaluación de las posibles propiedades antihiperálgicas de TNFR2-Fc_VH#4 FCA inducida por hipersensibilidad utilizando el método de soporte de peso. Las ratas no alteradas distribuyen su peso corporal por igual entre las dos patas traseras. Sin embargo, cuando la pata trasera inyectada (izquierda) está inflamada y/o dolorosa, el peso se redistribuye para que se aplique menos peso a la pata afectada (disminución del peso sobre la pata lesionada). La carga de peso a través de cada extremidad posterior se mide utilizando un medidor de incapacidad para ratas (Linton Instruments, Reino Unido). Las ratas se colocan en el probador de incapacidad con las patas traseras en sensores separados y la fuerza promedio ejercida por ambas extremidades posteriores se registra durante 4 segundos.

Para este estudio, las ratas no alteradas (ratas Sprague Dawley, macho (Harlan, Reino Unido), 198-258 g) se aclimataron a la sala de procedimientos en sus jaulas caseras, con comida y agua disponibles a voluntad. La habituación al probador de incapacidad se realizó durante varios días. Se tomaron registros basales de soporte de peso antes de la inducción del maltrato. La hipersensibilidad inflamatoria se indujo por inyección intraplantar de FCA (disponible a través de Sigma, 100 µL de solución de 1 mg/mL) en la pata trasera izquierda. Se realizó una medición de carga de peso previa al tratamiento para evaluar la hipersensibilidad 23 horas después de FCA.

Los animales se clasificaron y se asignaron al azar a grupos de tratamiento de acuerdo con la ventana de FCA con carga peso en un diseño cuadrado latino. A las 24 horas después de la inyección de FCA, los animales fueron tratados con TNFR2-Fc_VH#4 ("bienespecífico") administrado en forma iv a razón de 0,003; 0,01; 0,03; 0,3 y 3 mg/kg, un anticuerpo de control negativo, NIP228 (un anticuerpo generado para unirse al hapteno nitrofenol) administrado en forma iv a razón de 3 mg/kg, vehículo (metilcelulosa al 1%) administrado en forma po a razón de 2 mL/kg, o indometacina administrada en forma po a razón de 10 mg/kg.

Se evaluó el soporte de peso 4 y 24 horas después del tratamiento con anticuerpo/fármaco. Los datos se analizaron comparando grupos de tratamiento con el grupo de control con vehículo en cada punto de tiempo. El análisis estadístico incluyó medidas repetidas ANOVA seguidas de una prueba de comparación planificada usando InVivoStat (invivostat.co.uk), ($p < 0,05$ considerado significativo). Los resultados se muestran en la Figura 13) Se observó una reversión significativa de la hipersensibilidad con indometacina (10 mg/kg) a las 4 y 24 horas. TNFR2-Fc_VH#4 dosificado a razón de 0,3 y 3mg/kg mostró una reversión significativa de la hipersensibilidad tanto a 4 como 24 horas, TNFR2-Fc_VH#4 dosificado a razón de 0,003 y 0,03 mg/kg también mostró una reversión significativa de la hipersensibilidad, pero solo a las 24 horas. El control con isotipo, NIP228 no tuvo un efecto significativo sobre la respuesta a FCA en ningún momento.

Ejemplo 7 - Fosforilación de p38 por TNF α y NGF

La literatura sugiere que la fosforilación de p38 juega un papel importante en el desarrollo del dolor neuropático. Por ejemplo, se ha demostrado que el tratamiento con inhibidores de p38 previene el desarrollo de síntomas de dolor neuropático en el modelo de lesión nerviosa preservada (Wen YR et al., *Anesthesiology* 2007, 107: 312-321) y en un modelo de neuropatía inflamatoria ciática (Milligan ED et al., *J Neurosci* 2003, 23: 1026-1040). En el presente experimento, se investigó el papel de TNF α , NGF y la combinación de TNF α y NGF en la fosforilación de p38 en un ensayo de cultivo celular. En resumen, las células Neuroscreen-1 (un subclón de células neuroendocrinas de rata PC-12) se incubaron con cantidades crecientes de TNF α , NGF o una combinación de TNF α y NGF. Después de un período de incubación de 20 minutos, se cuantificó fosfo-p38 usando un ensayo de fluorescencia homogénea con resolución temporal (HTRF) (Cisbio).

Ensayo de HTRF: después de la estimulación con TNF α , NGF o una combinación de TNF α y NGF, los sobrenadantes celulares se eliminaron rápidamente y las células se lisaron en tampón de lisis. MAPK fosfo-p38 (Thr180/Tyr182) se detectó en lisados en un formato de ensayo tipo sándwich utilizando dos anticuerpos específicos diferentes; un anticuerpo anti-fosfo-p38 conjugado con criptato de europio (fluoróforo donante) y un anticuerpo anti-p38 (total)

conjugado con d2 (fluoróforo aceptor). Los anticuerpos se incubaron con lisados celulares y se calcularon las relaciones de HTRF a partir de mediciones de fluorescencia a 665 nm y 620 nm utilizando un lector de placas Multilabel EnVision (Perkin Elmer).

Los datos se presentan como relaciones HTRF, que se calculan como la relación entre la emisión a 665 nm y la emisión a 620 nm. En la Figura 14 se muestra un mapa de calor que muestra las relaciones de HTRF de las reacciones fosfo-p38. Las curvas de respuesta a la dosis que muestran el efecto de TNF α , NGF o una combinación de TNF α y NGF se muestran en la Figura 15. Como se puede observar a partir de la Figura 15, el efecto combinado de concentraciones más altas de TNF α y NGF sobre fosfo-p38 es mayor que la suma predicha de la señal de fosfo-p38 inducida por cualquiera de los factores solos. Estos datos sugieren que TNF α y NGF pueden actuar juntos para inducir la fosforilación de p38, y que las dos vías pueden estar implicadas en la señalización molecular que conduce al dolor.

Ejemplo 8 - Fosforilación de ERK por TNF α y NGF

Al igual que p38, ERK también se activa durante el desarrollo del dolor neuropático (Zhuang ZY et al., Pain 2005, 114: 149-159). En el presente experimento, se investigó el papel de TNF α , NGF y la combinación de TNF α y NGF sobre la fosforilación de ERK en un ensayo de cultivo celular. En resumen, las células Neuroscreen-1 (un subclón de células neuroendocrinas de rata PC-12) se incubaron con cantidades crecientes de TNF α , NGF o una combinación de TNF α y NGF. Después de un período de incubación de 20 minutos, se cuantificó fosfo-ERK usando un ensayo HTRF (Cisbio).

Ensayo HTRF: después de la estimulación, los sobrenadantes celulares se eliminaron rápidamente y las células se lisaron en tampón de lisis. Se detectó MAPK fosfo-ERK (Thr202/Tyr204) en lisados en un formato de ensayo tipo sándwich utilizando dos anticuerpos específicos diferentes; un anticuerpo anti-fosfo-ERK conjugado con criptato de europio (fluoróforo donante) y un anticuerpo anti-ERK (total) conjugado con d2 (fluoróforo aceptor). Los anticuerpos se incubaron con lisados celulares y se calcularon las relaciones de HTRF a partir de mediciones de fluorescencia a 665 nm y 620 nm utilizando un lector de placas Multilabel EnVision (Perkin Elmer).

Los datos se presentan como relaciones de HTRF, que se calculan como la relación entre la emisión a 665 nm y la emisión a 620 nm. Un mapa de calor que muestra las relaciones de HTRF de las reacciones de fosfo-ERK se muestra en la Figura 16. Las curvas de respuesta a la dosis que muestran el efecto de TNF α , NGF o una combinación de TNF α y NGF se muestran en la Figura 17. Como se puede observar a partir de la Figura 17, las bajas cantidades de TNF α solo no indujeron fosfo-ERK, pero las cantidades más altas aumentaron el fosfo-ERK inducido por NGF. Estos datos sugieren que TNF α y NGF pueden actuar juntos para inducir la fosforilación de p38, y que las dos vías pueden estar implicadas en la señalización molecular que conduce al dolor.

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 NP_002497.2| precursor del factor de crecimiento nervioso beta [Homo sapiens]

```

1  MSMLFYTLIT AFLIGIQAEP HSESNVPAGH TIPQAHWTKL QHSLDTALRR ARSAPAAAIA
61  ARVAGQTRNI TVDPRLFKKR RLRSRVLFS TQPPREAADT QDLDFEVGGA APFNRTHRSK
121 RSSSHPIFHR GEFSVCDSVS VWVGDKTTAT DIKGKEVMVL GEVNINNSVF KQYFFETKCR
181 DPNPVDSGCR GIDSKHWNSY CTTTHTFVKA LTMDGKQAAW RFIRIDTACV CVLSRKAVRR
241 A

```

SEQ ID NO: 2 NP_000585.2| factor de necrosis tumoral [Homo sapiens]

```

1  MSTESMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRRC LFLSLFSFLI VAGATTFLCL LHFVGIVGPQR
61  EEFPRLSLI SPLAQAVRSS SRTPSDKPVA HVVANPQAEQ QLQWLNRRAN ALLANGVELR
121 DNQLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPSTHV LLTHTISRIA VSYQTKVNLL SAIKSPCQRE

181 TPEGAEAKPW YEPIYLGGVF QLEKGDRLSA EINRPDYLDF AESGQVYFGI IAL

```

SEQ ID NO: 3 MEDI-578 VH (1256A5 VH)

```

1  QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS TYGISWVRQA PGQGLEWMGG IIPIFDTGNS
61  AQSFGQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSS RIYDLNPSLT AYYDMDVWGQ
121 GTMVTVSS

```

SEQ ID NO: 4 MEDI-578 VHCDR1

1 TYGIS

SEQ ID NO: 5 MEDI-578 VHCDR2

1 GIPIFDTGN SAQSFQG

SEQ ID NO: 6 MEDI-578 VHCDR3

1 SSRIYDLNPS LTAYYDMDV

SEQ ID NO: 7 MEDI-578 VL (1256A5 VL)

5

1 QSVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQL PGTAPKLLIY DNNKRPSGIP
61 DRFSGSKSGT SATLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSSLSAWV FGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 8 MEDI-578 VLCDR1

1 SGSSSNIGNN YVS

SEQ ID NO: 9 MEDI-578 VLCDR2

10

1 DNNKRPS

SEQ ID NO: 10 MEDI-578 VLCDR3

1 GTWDSSLSAW V

SEQ ID NO: 11

1 SSRIYDFNSA LISYYDMDV

15

SEQ ID NO: 12

1 SSRIYDMISS LQPYDMDV

SEQ ID NO: 13 secuencia de aminoácidos de TNFR2 soluble

1 LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTS D TVCDSCEDST
61 YTQLWNWVPE CLSCGSRCS DQVETQACTR EQNRICTRCP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK
121 CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS
181 TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPPSPAE GSTGDEPKSC
241 DKHTTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
361 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL
421 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

20

SEQ ID NO: 14 TNFR2-Fc_VH#4 - secuencia de aminoácidos

1 LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTS D TVCDSCEDST
61 YTQLWNWVPE CLSCGSRCS DQVETQACTR EQNRICTRCP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK
121 CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS
181 TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPPSPAE GSTGDEPKSC
241 DKHTTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
361 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL
421 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSQVQ
481 LVQSGAEVKK PGSSVKVCK ASGGTFSTYG ISWVRQAPGQ GLEWMGGIIP IFDTGNSAQS
541 FQGRVTITAD ESTSTAYMEL SSLRSEDYAV YYCARSSRIY DLNPSLTAYY DMDVWQGQTM
601 VTVSSGGGGG GGGGSGGGGS AQSFLTQPPS VSAAPGQKVT ISCSGSSSNI GNNYVSWYQQ
661 LPGAAPKLLI YDNNKRPSGI PDRFSGSKSG TSATLGITGL QTGDEADYYC GTWDSSLSAW
721 VFGGGTKLTV L

SEQ ID NO: 15 secuencia enlazadora de 15 aa (Gly₉Ser)₃

25

1 GGGGSGGGGS GGGGS

SEQ ID NO: 16 TNFR2-Fc_VH#4 - secuencia de nucleótidos

ES 2 784 238 T3

```

1 CTGCCCCGCC AGGTGGCCTT TACCCCTTAT GCCCCCGAGC CCGGCAGCAC CTGTCGGCTG
61 AGAGAGTACT ACGACCAGAC CGCCCAGATG TGCTGCAGCA AGTGCTCTCC TGGCCAGCAT
121 GCCAAGGTGT TCTGCACCAA GACCAGCGAC ACCGTGTGCG ACAGCTGCGA GGACAGCACC
181 TACACCAGC TGTGGAAGT GGTGCCCGAG TGCCTGAGCT GCGGCAGCAG ATGCAGCAGC
241 GACCAGGTGG AAACCCAGGC CTGCACCAGA GAGCAGAACC GGATCTGCAC CTGTAGACCC
301 GGCTGGTACT GCGCCCTGAG CAAGCAGGAA GGCTGCAGAC TCTGCGCCCC TCTGCGGAAG
361 TGCAGACCCG GCTTTGGCGT GGCCAGACCC GGCACCGAGA CAAGCGACGT GGTCTGTAAG
421 CCCTGCGCTC CTGGCACCTT CAGCAACACC ACCAGCAGCA CCGACATCTG CAGACCCAC
481 CAGATCTGCA ACGTGGTGGC CATCCCCGGC AACGCCAGCA TGGATGCCGT CTGCACCAGC
541 ACTAGCCCCA CCAGAAGTAT GGCCCCTGGC GCCGTGCATC TGCCCCAGCC TGTGTCCACC
601 AGAAGCCAGC ACACCCAGCC CACCCCTGAG CCTAGCACCG CCCCCTCCAC CAGCTTTCTG
661 CTGCCTATGG GCCCTAGCCC TCCAGCCGAG GGAAGCACAG GCGACGAGCC CAAGAGCTGC
721 GACAAGACCC ACACCTGTCC CCCCTGCCCT GCCCCTGAAC TGCTGGGCGG ACCCAGCGTG
781 TTCCTGTTCC CCCCAGGCC CAAGGACACC CTGATGATCA GCCGGACCCC CGAAGTGACC
841 TGCGTGGTGG TGGACGTGTC CCACGAGGAC CCTGAAGTGA AGTTCAATTG GTACGTGGAC
901 GGCGTGGGAG TGCACAACGC CAAGACCAAG CCCAGAGAGG AACAGTACAA CTCCACCTAC
961 CGGGTGGTGT CCGTGCTGAC CGTGCTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA AGAGTACAAG
1021 TGCAAGGTCT CCAACAAGGC CCTGCCTGCC CCCATCGAGA AAACCATCAG CAAGGCCAAG
1081 GGCCAGCCCC GCGAGCCTCA GGTGTACACA CTGCCCCCA GCCGGAAGA GATGACCAAG
1141 AACCAGGTGT CCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGATAT CGCCGTGGAA
1201 TGGGAGAGCA ATGGCCAGCC CGAGAACAAC TACAAGACCA CCCCCCTGT GCTGGACAGC
1261 GACGGCTCAT TCTTCTGTGTA CAGCAAGCTG ACCGTGGACA AGAGCCGGTG GCAGCAGGGC
1321 AACGTGTTCA GCTGCAGCGT GATGCACGAG GCCCTGCACA ACCACTACAC CCAGAAGTCC
1381 CTGAGCCTGA GCCCCGAAA GGGCGGTGGC GGATCCGGAG GTGGGGGATC TCAGGTGCAG
1441 CTGGTGACGT CTGGCGCCGA AGTGAAGAAA CCCGGCTCTA GCGTGAAGGT GTCCTGCAAG
1501 GCCAGCGGCG GCACCTTCTC CACCTACGGC ATCAGCTGGG TCCGCCAGGC CCCTGGACAG
1561 GGCCTGGAAT GGATGGGCGG CATCATCCCC ATCTTCGACA CCGGCAACAG CGCCCAGAGC
1621 TTCCAGGGCA GAGTGACCAT CACCGCCGAC GAGAGCACCT CCACCGCTA CATGGAAGTG
1681 AGCAGCCTGC GGAGCGAGGA CACCGCCGTG TACTACTGCG CCAGAAGCAG CCGGATCTAC
1741 GACCTGAACC CCAGCCTGAC CGCCTACTAC GACATGGACG TGTGGGGCCA GGGCACCATG
1801 GTCACAGTGT CTAGCGGAGG CGGCGGATCT GCGGCGGAG GAAGTGGCGG GGGAGGATCT
1861 GCCCAGAGCG TGCTGACCCA GCCCCCTTCT GTGTCTGCCG CCCCTGGCCA GAAAGTGACC
1921 ATCTCTGCA GCGGCAGCAG CAGCAACATC GGCAACAAC ACCTGTCTCT GTATCAGCAG
1981 CTGCCCCGCA CCGCCCTTAA GCTGCTGATC TACGACAACA ACAAGCGGCC CAGCGGCATC
2041 CCCGACCGGT TTAGCGGCAG CAAGAGCGGG ACTTCTGCTA CACTGGGCAT CACAGCCTG
2101 CAGACCGGCG ACGAGGCCGA CTACTACTGC GGCACCTGGG ACAGCAGCCT GAGCGCTTGG
2161 GTGTTCCGCG GAGGCACCAA GCTGACAGTG CTG

```

SEQ ID NO: 17 - TNFR2-Fc_varB - secuencia de aminoácidos

```

1 LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSFGQH AKVFCTKTS D TVCDSCEDST
61 YTQLWNWVPE CLSCGSRCSS DQVETQACTR EQNRICTRP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK
121 CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS
181 TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPPSPAE GSTGDEPKSC
241 DKHTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
361 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
421 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSQVQ
481 LVQSGAEVKK PGSSVKVSCK ASGGTFSTYG ISWVRQAPGQ CLEWMGGIIP IFDTGNSAQS
541 FQGRVTITAD ESTSTAYMEL SSLRSEDYAV YYCARSSRIY DLNPSLTAYY DMDVWQGQTM
601 VTVSSGGGGG GGGGSGGGGS GGGGGQSVLT QPPSVSAAPG QKVTISCSGS SSNIGNNYVS
661 WYQQLPGTAP KLLIYDNNKR PSGIPDRFSG SKSGTSATLG ITGLQTGDEA DYICGTWDSS
721 LSAWVFGCGT KLTVL

```

5 SEQ ID NO: 18 - TNFR2-Fc_varB - secuencia de nucleótidos

ES 2 784 238 T3

```

1 CTGCCCCGCC AGGTGGCCTT TACCCCTTAT GCCCCCGAGC CCGGCAGCAC CTGTCCGGCTG
61 AGAGAGTACT ACGACCAGAC CGCCCAGATG TGCTGCAGCA AGTGCTCTCC TGGCCAGCAT
121 GCCAAGGTGT TCTGCACCAA GACCAGCGAC ACCGTGTGCG ACAGCTGCGA GGACAGCACC
181 TACACCAGC TGTGGAAGT GGTGCCCGAG TGCCTGAGCT GCGGCAGCAG ATGCAGCAGC
241 GACCAGGTGG AAACCCAGGC CTGCACCAGA GAGCAGAACC GGATCTGCAC CTGTAGACCC
301 GGCTGGTACT GCGCCCTGAG CAAGCAGGAA GGCTGCAGAC TCTGCGCCCC TCTGCGGAAG
361 TGCAGACCCG GCTTTGGCGT GGCCAGACCC GGCACCGAGA CAAGCGACGT GGTCTGCAAG
421 CCCTGCGCTC CTGGCACCTT CAGCAACACC ACCAGCAGCA CCGACATCTG CAGACCCAC
481 CAGATCTGCA ACGTGGTGGC CATCCCCGGC AACGCCAGCA TGGATGCCGT GTGCACCAGC
541 ACCAGCCCCA CCAGAAGTAT GGCCCCTGGC GCCGTGCATC TGCCCCAGCC TGTGTCCACC
601 AGAAGCCAGC ACACCCAGCC CACCCCTGAG CCTAGCACCG CCCCCTCCAC CAGCTTTCTG
661 CTGCCTATGG GCCCTAGCCC TCCAGCCGAG GGAAGCACAG GCGACGAGCC CAAGAGCTGC
721 GACAAGACCC ACACCTGTCC CCCCTGCCCT GCCCCTGAAC TGCTGGGCGG ACCCAGCGTG
781 TTCCTGTTCC CCCCAGGCC CAAGGACACC CTGATGATCA GCCCGACCCC CGAAGTGACC
841 TGCGTGGTGG TGGACGTGTC CCACGAGGAC CCTGAAGTGA AGTTCAATTG GTACGTGGAC
901 GGCGTGGGAG TGCACAACGC CAAGACCAAG CCCAGAGAGG AACAGTACAA CTCACCTAC
961 CGGGTGGTGT CCGTGCTGAC CGTGCTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA AGAGTACAAG
1021 TGCAAAGTCT CCAACAAGGC CCTGCCTGCC CCCATCGAGA AAACCATCAG CAAGGCCAAG
1081 GGCCAGCCCC GCGAGCCTCA gGTGTACACA CTGCCCCCA GCCGGAAGA GATGACCAAG
1141 AACCAGGTGT CCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGATAT CGCCGTGGAA
1201 TGGGAGAGCA ACGGCCAGCC CGAGAACAAC TACAAGACCA CCCCCCTGT GCTGGACAGC
1261 GACGGCTCAT TCTTCTGTGTA CAGCAAGCTG ACCGTGGACA AGAGCCGGTG GCAGCAGGGC
1321 AATGTCTTCA GCTGTAGCGT GATGCACGAG GCCCTGCACA ACCACTACAC CCAGAAGTCC
1381 CTGAGCCTGA GCCCCGAAA GGGCGGAGGC GGATCCGGAG GTGGGGGATC TCAGGTGCAG
1441 CTGGTGAGT CTGGCGCGA AGTGAAGAAA CCCGGCTCTA GCGTGAAGGT GTCCTGCAAG
1501 GCCAGCGCGC GCACCTTCTC CACCTACGGC ATCAGCTGGG TCCGCCAGGC CCCTGGACAG
1561 TGTCTGGAAT GGATGGGCGG CATCATCCCC ATCTTCGACA CCGGCAACAG CGCCCAGAGC
1621 TTCCAGGGCA GAGTGACCAT CACCGCCGAC GAGAGCACCT CCACCGCTA CATGGAAGT
1681 AGCAGCCTGC GGAGCGAGGA CACCGCCGTG TACTACTGCG CCAGAAGCAG CCGGATCTAC
1741 GACCTGAACC CCAGCCTGAC CGCTACTAC GACATGGACG TGTGGGGCCA GGGCACCATG
1801 GTCACAGTGT CTAGCGGAGG CGGAGGCAGC GGAGGTGGTG GATCTGGTGG CGGAGGAAGT
1861 GGCGGCGGAG GCTCTCAGAG CGTGCTGACC CAGCCCCCTT CTGTGTCTGC CGCCCCTGGC
1921 CAGAAAGTGA CCATCTCCTG CAGCGGCAGC AGCAGCAACA TCGGCAACAA CTACGTGTCC
1981 TGGTATCAGC AGCTGCCCGG CACCGCCCTT AAGCTGTGTA TCTACGACAA CAACAAGCGG
2041 CCCAGCGGCA TCCCCGACCG GTTTAGCGGC AGCAAGAGCG GGACTTCTGC TACATGGGC
2101 ATCACAGGCC TGCAGACCGG CGACGAGGCC GACTACTACT GCGGCACCTG GGACAGCAGC
2161 CTGAGCGCTT GGGTGTTCGG CTGCGGCACC AAGCTGACAG TGCTG

```

SEQ ID NO: 19 - secuencia enlazadora de 20 aa (Gly₄Ser)₄

1 GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 20 - ndimab varB - secuencia de aminoácidos de cadena L

5

```

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRAIGIPA
61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP
121 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL
181 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC

```

SEQ ID NO: 21 - ndimab varB - secuencia de aminoácidos de cadena L

```

1 GAAATCGTGC TGACCCAGAG CCCCGCCACC CTGTCTCTGA GCCCTGGCGA GAGAGCCACC
61 CTGAGCTGCA GAGCCAGCCA GAGCGTGTAC TCCTACCTGG CTTGGTATCA GCAGAAGCCC
121 GGCCAGGCCC CCAGACTGCT GATCTACGAC GCCAGCAACC GGGCCATCGG CATCCCTGCC
181 AGATTTTCTG GCAGCGGCAG CGGCACCGAC TTCACCTGA CCATCAGCAG CCTGGAAACC
241 GAGGACTTCG CCGTGTACTA CTGCCAGCAG CGGAGCAACT GGCCCCCTT CACCTTCGGC
301 CCTGGCACCA AGGTGGACAT CAAGCGTACG GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCG
361 CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAAG GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC
421 TATCCCAGAG AGGCCAAAGT ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC
481 CAGGAGAGTG TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCTG
541 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT CACCCATCAG
601 GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG AGTGT

```

10 SEQ ID NO: 22 - ndimab varB - secuencia de aminoácidos de cadena H

ES 2 784 238 T3

```

1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFIFS SYAMHWVRQA PNGLEWVAF MSYDGSNKKY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR GISAGGNYYY YGMDVWGQGT
121 TVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP
181 AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KHTCPCPCPA
241 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
301 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
361 PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT
421 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGKGGGG SGGGGSQVQL VQSGAEVKKP
481 GSSVKVSCKA SGGTFSTYGI SWVRQAPGQC LEWMGGIPI FDTGNSAQSF QGRVTITADE
541 STSTAYMELS SLRSEDNAVY YCARSSRIYD LNPSLTAYYD MDVWGQGTMTV TVSSGGGGSG
601 GGGSGGGGSG GGGGSQSVLTQ PPSVSAAPGQ KVTISCSGSS SNIGNNYVSW YQQLPGTAPK
661 LLIYDNNKRP SGIPDRFSGS KSGTSATLGI TGLQTGDEAD YYCGTWDSSL SAWVFCGCTK
721 LTVL

```

SEQ ID NO: 23 - ndimab varB - secuencia de nucleótidos de cadena H

```

1 CAGGTGCAGC TGGTGGAAAG CGGCGGAGGC GTGGTGCAGC CCGGCAGAAG CCTGAGACTG
61 AGCTGCGCTG CCAGCGGCTT CATCTTCAGC AGCTACGCCA TGCACTGGGT CCGCCAGGCC
121 CCTGGCAACG GACTGGAATG GGTGGCCTTC ATGAGCTACG ACGGCAGCAA CAAGAAGTAC
181 GCCGACAGCG TGAAGGGCCG GTTCAACATC AGCCGGGACA ACAGCAAGAA CACCCTGTAC
241 CTGCAGATGA ACAGCCTGCG GGCTGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CAGAGACCGA
301 GGCATCAGTG CTGGCGGCAA CTACTACTAC TACGGCATGG ACGTGTGGGG CCAGGGCACC
361 ACCGTGACCG TGTCTAGCGC GTCGACCAAG GGCCCATCCG TCTTCCCCCT GGCAACCCTC
421 TCCAAGAGCA CCTCTGGGGG CACAGCGGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCCC
481 GAACCGGTGA CGGTGTCCTG GAACTCAGGC GCTCTGACCA GCGGCGTGCA CACCTTCCCG
541 GCTGTCTTAC AGTCTCAGG ACTCTACTCC CTCAGCAGCG TGGTGACCGT GCCCTCCAGC
601 AGCTTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAATCACA AGCCAGCAA CACCAAGGTG
661 GACAAGAGAG TTGAGCCCAA ATCTTGTCGAC AAAACTCACA CATGCCCCACC GTGCCAGCA
721 CCTGAACCTC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC
781 ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGTC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT
841 GAGGTCAAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAGCCG
901 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG
961 GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC
1021 ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT CTACACCCTG
1081 CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC
5 1141 TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACACTAC

1201 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGAATCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC
1261 GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT
1321 CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAAGT CGGAGGGGGA
1381 TCCGGCGGAG GGGGCTCTCA GGTGCAGCTG GTGCAGTCTG GCGCCGAAGT GAAGAAACCC
1441 GGCTCTAGCG TGAAGGTGTC CTGCAAGGCC AGCGGCGGCA CCTTCTCCAC CTACGGCATC
1501 AGCTGGGTCC GCCAGGCCCC TGGACAGTGT CTGGAATGGA TGGGCGGCAT CATCCCCATC
1561 TTCGACACCG GCAACAGCGC CCAGAGCTTC CAGGGCAGAG TGACCATCAC CGCCGACGAG
1621 AGCACCTCCA CCGCTACAT GGAATGAGC AGCCTGCGGA GCGAGGACAC CGCCGTGTAC
1681 TACTGCGCCA GAAGCAGCCG GATCTACGAC CTGAACCCCA GCCTGACCGC CTACTACGAC
1741 ATGGACGTGT GGGGCCAGGG CACCATGGTC ACAGTGTCTA GCGGAGGCGG AGGCAGCGGA
1801 GGTGGTGGAT CTGGTGGCGG AGGAAGTGGC GGCGGAGGCT CTCAGAGCGT GCTGACCCAG
1861 CCCCCTTCTG TGTCTGCCGC CCCTGGCCAG AAAGTGACCA TCTCCTGCAG CGGCAGCAGC
1921 AGCAACATCG GCAACAATA CTGTCTCTGG TATCAGCAGC TGCCCGGCAC CGCCCCTAAG
1981 CTGCTGATCT ACGACAACAA CAAGCGGCCC AGCGGCATCC CCGACCGGTT TAGCGGCAGC
2041 AAGAGCGGGA CTTCTGCTAC ACTGGGCATC ACAGGCCTGC AGACCGGCGA CGAGGCCGAC
2101 TACTACTGCG GCACCTGGGA CAGCAGCCTG AGCGCTTGGG TGTTCTGGCTG CGGCACCAAG
2161 CTGACAGTGC TG

```

SEQ ID NO: 24 - secuencia de aminoácidos de VH de NGF-NG

```

10 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFWFGAFTWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGLTNLAQNFAQGRVTITADESTST
VYMELSSLSRSEDNAVYYCARSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVTVSS

```

SEQ ID NO: 25 - secuencia de nucleótidos de VH de NGF-NG

ES 2 784 238 T3

```
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcttgcaagg cctctggagg caccttctgg ttcggcgctg tcacctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag gacttgagtg gatgggaggg attattccta tcttcgggtt gacgaacttg 180
gcacagaact tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcttgag atctgaagac acggccgtat attattgtgc acgttcaagt 300
cgtatctacg atctgaaccc gtccctgacc gcctactacg atatggatgt ctggggccag 360
gggacaatgg tcaccgtctc gagt 384
```

SEQ ID NO: 26 - secuencia de aminoácidos de VL de NGF-NG

```
5 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL
```

SEQ ID NO: 27 - secuencia de nucleótidos de VL de NGF-NG

```
cagtctgtgc tgactcagcc gccatcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tctgtctctg gaagcagctc cgacattggg aataattatg tatcgtgta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcagc tcagccacc cgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggcgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgcttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
```

SEQ ID NO: 28 - secuencia de aminoácidos de VH de ndimab

```
10 1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFIFS SYAMHWVRQA PNGLEWVAF MSYDGSNKKY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR GISAGGNYYY YGMDVWGQGT
121 TVTVSS
```

SEQ ID NO: 29 - secuencia de aminoácidos de VL de ndimab

```
1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRAIGIPA
61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG PGTKVDIK
```

15 SEQ ID NO: 30 - secuencia de aminoácidos de VH de 1126F1

```
EVQLVQTGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDANRQAVPYDMVWVGQGTMTVSS
```

SEQ ID NO: 31 - secuencia de aminoácidos de VL de 1126F1

```
20 QAVLTQPSSVSTPPGQMVTISCSGSSSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL
```

SEQ ID NO: 32 - secuencia de aminoácidos de VH de 1126G5

```
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFTSGLAPYYDMVWVGQGTMTVSS
```

SEQ ID NO: 33 - secuencia de aminoácidos de VL de 1126G5

```
25 QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPPGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSTWVFGGGTKLTVL
```

SEQ ID NO: 34 - secuencia de aminoácidos de VH de 1126H5

```
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDAGNSAQSFQGRVTITADESTST
AHMEVSSLRSEDYAVYYCASSSRIYDHHIQGGYYDMVWVGQGTMTVSS
```

30 SEQ ID NO: 35 - secuencia de aminoácidos de VL de 1126H5

ES 2 784 238 T3

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 36 - secuencia de aminoácidos de VH de 1127D9

5 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDYHTIAYYD

SEQ ID NO: 37 - secuencia de aminoácidos de VL de 1127D9

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 38 - secuencia de aminoácidos de VH de 1127F9

10 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMKVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDIIPGMRPYDMDVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 39 - secuencia de aminoácidos de VL de 1127F9

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGNSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSRSGTLATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

15 SEQ ID NO: 40 - secuencia de aminoácidos de VH de 1131D7

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFNSSLIAYYDMDVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 41 - secuencia de aminoácidos de VL de 1131D7

20 QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 42 - secuencia de aminoácidos de VH de 1131H2

EVQLVQSGAEVKKPGSTVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 43 - secuencia de aminoácidos de VL de 1131H2

25 QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGTSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 44 - secuencia de aminoácidos de VH de 132A9

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFGTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFEPSLIYYDMDVWGQGTMTVSS

30 SEQ ID NO: 45 - secuencia de aminoácidos de VL de 132A9

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 46 - secuencia de aminoácidos de VH de 1132H9

35 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 47 - secuencia de aminoácidos de VL de 1132H9

ES 2 784 238 T3

QAVLTQPPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPTGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 48 - secuencia de aminoácidos de VH de 1133C11

5 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 49 - secuencia de aminoácidos de VL de 1133C11

QAVLTQPPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 50 - secuencia de aminoácidos de VH de 1134D9

10 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVAITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 51 - secuencia de aminoácidos de VL de 1134D9

QAVLTQPPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 52 - secuencia de aminoácidos de VH de 1145D1

15 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTSNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFRTLYSTYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 53 - secuencia de aminoácidos de VL de 1145D1

QAVLTQPPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGISDRFSGSKSGTSATLGIAG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

20 SEQ ID NO: 54 - secuencia de aminoácidos de VH de 1146D7

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 55 - secuencia de aminoácidos de VL de 1146D7

25 QAVLTQPPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 56 - secuencia de aminoácidos de VH de 1147D2

EVQLVQSGAEVKKPGSSVRISKASGGTFSTYGVSWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 57 - secuencia de aminoácidos de VL de 1147D2

30 QAVLTQPPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 58 - secuencia de aminoácidos de VH de 1147G9

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTF SAYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFNTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVTV

35 SEQ ID NO: 59 - secuencia de aminoácidos de VL de 1147G9

QAVLTQPPSSVSTPPGQKVTIVSCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 60 - secuencia de aminoácidos de VH de 1150F1

5 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQDRVTITADESTST
AYMEVGSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGHGTMVTVSS

SEQ ID NO: 61 - secuencia de aminoácidos de VL de 1150F1

QAVLTQPPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 62 - secuencia de aminoácidos de VH de 1152H5

10 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLVWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDMISLQPYDMDVWQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 63 - secuencia de aminoácidos de VL de 1152H5

QAVLTQPPSSVSTPPGQKATISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

15 SEQ ID NO: 64 - secuencia de aminoácidos de VH de 1155H1

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFHLANKGYDMDVWQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 65 - secuencia de aminoácidos de VL de 1155H1

20 QAVLTQPPSSVSTPPGQKATISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLDITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 66 - secuencia de aminoácidos de VH de 1158A1

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFGTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDHHNHVGGYYDMDVWQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 67 - secuencia de aminoácidos de VL de 1158A1

25 QAVLTQPPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYASWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDGSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 68 - secuencia de aminoácidos de VH de 1160E3

EVQLVQSGAEVKKPGSSAKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWQGTMTVTVSS

30 SEQ ID NO: 69 - secuencia de aminoácidos de VL de 1160E3

QAVLTQPPSSVSTPPGQKVTISCSGSNSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 70 - secuencia de aminoácidos de VH de 1165D4

35 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 71 - secuencia de aminoácidos de VL de 1165D4

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIENNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 72 - secuencia de aminoácidos de VH de 1175H8

5

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQRLEWIGGIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSRIYDATTGLTPYYDMVWVGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 73 - secuencia de aminoácidos de VL de 1175H8

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIENNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LRTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

10 SEQ ID NO: 74 - secuencia de aminoácidos de VH de 1211G10

EVQLVQSGAEVRKPGSSVKVCKAYGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWVGGIPIFDTRNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSRIYDMVSTLIPYYDMVWVGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 75 - secuencia de aminoácidos de VL de 1211G10

15

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIENNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 76 - secuencia de aminoácidos de VH de 1214A1

EVQLVQSGAEVKKPGSSVRVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSRIYDAHLQAYYDMVWVGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 77 - secuencia de aminoácidos de VL de 1214A1

20

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIENNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPPGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTRDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 78 - secuencia de aminoácidos de VH de 1214D10

EVQLVQSGAEAKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGRGLEWIGGIPIFDTGNSAQSFQGRVAITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSRIYDAHLNHHGYDMVWVGQGTMTVSS

25 SEQ ID NO: 79 - secuencia de aminoácidos de VL de 1214D10

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIENNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQAGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 80 - secuencia de aminoácidos de VH de 1218H5

30

EVQLVQSGAVVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIPIFDTGSSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSRIYDLNPSLTAYYDMVWVGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 81 - secuencia de aminoácidos de VL de 1218H5

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNTGNVSWYQQLSGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 82 - secuencia de aminoácidos de VH de 1230H7

35

EMQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADESTST
AYMEVSSLRSDDTAVYYCASSRIYDFNSALISYYDMVWVGQGTMTVSS

ES 2 784 238 T3

SEQ ID NO: 83 - secuencia de aminoácidos de VL de 1230H7

QAVLTQPPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG
LQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTV

SEQ ID NO: 84 - secuencia de aminoácidos de VH de 1083H4

5

QMQLVQSGAEVKKTGSSSVKVSCKASGYTFAYHYLHWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTTNYAQRFDQDRVTITADESTST
AYMELSSLRSED TAVYYCASADYVWGSYRPDWYFDLWGRGTMVTVSS

SEQ ID NO: 85 - secuencia de aminoácidos de VL de 1083H4

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQRLPGAAPQLLIYNNDQRPSGIPDRFSGSKSGTSGSLVISG
LQSEDEADYYCASWDDSLNGRVFGGGTKLTVL

10 SEQ ID NO: 86 - secuencia de aminoácidos de VH de 1227H8

QMQLVQSGAEVKKTGSSSVKVSCKASGHTFAYHYLHWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTTNYAQRFDQDRVTITADESTST
AYMELSSLRSED TAVYYCASADYAWESYQPPQINGVWGRGTMVTVSS

SEQ ID NO: 87 - secuencia de aminoácidos de VL de 1227H8

15

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTITCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISG
LQSEDEADYYCAAWDDSLSEFFFGTGKLTVL

SEQ ID NO: 88 - NGF-NG HCDR1

FGAFT

SEQ ID NO: 89 - NGF-NG HCDR2

20

GIIPFGLTNLAQNFQG

SEQ ID NO: 90 - NGF-NG HCDR3

SSRIYDLNPSLTAYYDMDV

25

SEQ ID NO: 91 - NGF-NG LCDR1

SGSSSDIGNNYVS

SEQ ID NO: 92 - NGF-NG LCDR2

30

DNNKRPS

SEQ ID NO: 93 - NGF-NG LCDR3

GTWDSSLSAWV

SEQ ID NO: 94 - secuencia de aminoácidos de VH de MEDI-578 con G->C

35

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS TYGISWVRQA PGQCLEWMGG IIPFDGTGNS
AQSFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSS RIYDLNPSLT AYYDMDVWGQ
GTMVTVSS

SEQ ID NO: 95 - secuencia de aminoácidos de VL de MEDI-578 con G->C

QSVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQL PGTAPKLLIY DNNKRPSGIP
DRFSGSKSGT SATLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSSLSAWV FGCGTKLTVL

SEQ ID NO: 96 - secuencia de aminoácidos de VH de 1230D8

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTFPHYHLHWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTTNYAQRFDQDRVITITADESTST
AYMEFSSLRSEDYVYYCASADYVWESYHPATSLSLWGRGTMVTVSS

SEQ ID NO: 97 - secuencia de aminoácidos de VL de 1230D8

5 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCPGSTSNIENNYVSWYQQRPGKAPKLMIDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISE
LQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGKLTVL

SEQ ID NO: 98

GGGGSGGGGS

10 SEQ ID NO: 99 - TNFR2-Fc_varB – secuencia de nucleótidos de codón optimizado

1	CTGCCC GCCC	AGGTGG CCTT	TACCCCTTAT	GCTCCTGAGC	CCGGCTCTAC	CTGCCGGCTG
61	AGAGAGTACT	ACGACCAGAC	CGCCCAGATG	TGCTGCTCCA	AGTGCTCTCC	TGGCCAGCAC
121	GCCAAGGTGT	TCTGCACCAA	GACCTCCGAT	ACCGTGTGCG	ACTCCTGCGA	GGACTCCACC
181	TACACCCAGC	TGTGGAAGTG	GGTGCCCGAG	TGCCTGTCTT	GCGGCTCCAG	ATGTTCTCTC
241	GACCAGGTGG	AAACCCAGGC	CTGCACCAGA	GAGCAGAACC	GGATCTGCAC	CTGTCGGCCT
301	GGCTGGTACT	GCGCCCTGTC	TAAGCAGGAA	GGCTGCAGAC	TGTGCGCCCC	TCTGCGGAAG
361	TGTAGACCTG	GCTTTGGCGT	GGCCAGACCC	GGCACCAGAG	CATCTGATGT	CGTGTGCAAG
421	CCTTGCGCCC	CTGGCACCTT	CTCCAACACC	ACCTCCTCCA	CCGACATCTG	CCGGCCTCAC
481	CAGATCTGCA	ACGTGGTGGC	CATCCCTGGC	AACGCCTCTA	TGGACGCCGT	GTGCACCTCT
541	ACCTCCCCCA	CCAGAAGTAT	GGCCCTGGC	GCTGTGCATC	TGCCCCAGCC	TGTGTCTACC
601	AGATCCCAGC	ACACCCAGCC	CACCCCTGAG	CCTTCTACCG	CCCCTTCTAC	CAGCTTCCTG
661	CTGCCTATGG	GCCCTAGCCC	TCCTGCTGAG	GGATCTACAG	GCGACGAGCC	CAAGTCCTGC
721	GACAAGACCC	ACACCTGTCC	CCCTTGCTCT	GCCCTGAAC	TGCTGGGCGG	ACCTTCCGTG
781	TTCTGTGTCC	CCCCAAAGCC	CAAGGACACC	CTGATGATCA	GCCGGACCCC	TGAAGTGACC
841	TGCGTGGTGG	TGGATGTGTC	CCACGAGGAT	CCCGAAGTGA	AGTTCAATTG	GTACGTGGAC
901	GGCGTGGAAG	TGCACAACGC	CAAGACCAAG	CCCAGAGAGG	AACAGTACAA	CTCCACCTAC
961	CGGGTGGTGT	CCGTGCTGAC	CGTGCTGCAC	CAGGATTGGC	TGAACGGCAA	AGAGTACAAG
1021	TGCAAGGTGT	CCAACAAGGC	CCTGCCTGCC	CCCATCGAAA	AGACCATCTC	CAAGGCCAAG
1081	GGCCAGCCCC	GGGAACCCCA	GGGTGTACACA	CTGCCCCCTA	GCCGGGAAGA	GATGACCAAG
1141	AACCAGGTGT	CCCTGACCTG	TCTCGTGAAG	GGCTTCTACC	CCTCCGATAT	CGCCGTGGAA
1201	TGGGAGTCCA	ACGGCCAGCC	TGAGAACAAC	TACAAGACCA	CCCCCCTGT	GCTGGACTCC
1261	GACGGCTCAT	TCTTCCTGTA	CTCCAAGCTG	ACAGTGGACA	AGTCCCGGTG	GCAGCAGGGC
1321	AACGTGTTCT	CCTGCTCCGT	GATGCACGAG	GCCCTGCACA	ACCAATACAC	CCAGAACTCC
1381	CTGTCCCTGA	GCCCTGGAAA	AGGCGGCGGA	GGATCTGGCG	GAGGCGGATC	TCAGGTGCAG
1441	CTGGTGCAGT	CTGGCGCTGA	AGTGAAGAAA	CCCGGCTCCT	CCGTGAAGGT	GTCTGTCAAG
1501	GCTTCTGGCG	GCACCTTCTC	TACCTACGGC	ATCTCCTGGG	TGCGACAGGC	CCCTGGCCAG
1561	TGCGTGGAAT	GGATGGGCGG	CATCATCCCC	ATCTTCGACA	CCGGCAACTC	CGCCAGAGC
1621	TTCCAGGGCA	GAGTGACCAT	CACCGCCGAC	GAGTCTACCT	CCACCGCCTA	CATGGAACCTG
1681	TCCTCCCTGC	GGAGCGAGGA	CACCGCCGTG	TACTACTGCG	CCCGGTCTCT	TCGGATCTAC
1741	GACCTGAACC	CTTCCCTGAC	CGCCTACTAC	GACATGGACG	TGTGGGGCCA	GGGCACAATG
1801	GTCACCGTGT	CATCTGGTGG	TGGCGGCTCT	GGTGGCGGAG	GAAGTGGGGG	AGGGGGTTCT
1861	GGGGGGGGGAG	GATCTCAGTC	TGTGCTGACC	CAGCCTCCTT	CCGTGTCTGC	TGCCCCAGGC
1921	CAGAAAGTGA	CAATCTCCTG	CAGCGGCTCC	AGCTCCAACA	TCGGCAACAA	CTACGTGTCC
1981	TGGTATCAGC	AGCTGCCCCG	CACCGCTCCC	AAACTGCTGA	TCTACGATAA	CAACAAGCGG
2041	CCCTCCGGCA	TCCCCGACAG	ATTCTCCGGC	TCTAAGTCCG	GCACCTCTGC	CACCTTGGGC
2101	ATCACCGGAC	TGCAGACAGG	CGACGAGGCC	GACTACTACT	GTGGCACCTG	GGACTCCTCC
2161	CTGTCCGCTT	GGGTGTTCCG	CTGCGGCACC	AAACTGACTG	TGCTG	

- 15 La divulgación no está limitada en su alcance por los aspectos específicos descritos que pretenden ser sólo ilustraciones de aspectos individuales de la divulgación, y cualquier composición o método que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de esta divulgación. De hecho, diversas modificaciones de la divulgación además de las mostradas y descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y los dibujos adjuntos. Dichas modificaciones están destinadas a caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.
- 20

Listado de secuencias

<110> MEDIMMUNE LIMITED

<120> COMPUESTOS Y MÉTODOS PARA TRATAMIENTO DEL DOLOR

<130> 110421-0054-WO1

5 <140>
<141>

<150> 61/934,828

<151> 2014-02-02

<160> 99

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 241

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 1

Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ile
1 5 10 15

Gln Ala Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile
20 25 30

Pro Gln Ala His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu
35 40 45

Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala
50 55 60

Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg
65 70 75 80

Arg Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu
85 90 95

Ala Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro
100 105 110

Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe
115 120 125

His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly
130 135 140

Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu
145 150 155 160

ES 2 784 238 T3

Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu
165 170 175

Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile
180 185 190

Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val
195 200 205

Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg
210 215 220

Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg
225 230 235 240

Ala

<210> 2

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
35 40 45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
100 105 110

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
115 120 125

ES 2 784 238 T3

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
145 150 155 160

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
180 185 190

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
225 230

<210> 3

5 <211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

ES 2 784 238 T3

Ala Arg Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 4

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

10 <400> 4

Thr Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 5

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

20 <400> 5

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 6

25 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

30 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 6

Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr Tyr Asp
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 7

35 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

40 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 784 238 T3

<400> 7

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 8

5 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 8

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 9

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

20 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 9

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 10

25 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

30 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 10

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val
1 5 10

<210> 11

5 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 11

Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe Asn Ser Ala Leu Ile Ser Tyr Tyr Asp
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 12

15 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

20 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 12

Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Met Ile Ser Ser Leu Gln Pro Tyr Tyr Asp
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 13

25 <211> 467

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

30 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 13

ES 2 784 238 T3

Leu	Pro	Ala	Gln	Val	Ala	Phe	Thr	Pro	Tyr	Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Ser	
1				5					10					15		
Thr	Cys	Arg	Leu	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Thr	Ala	Gln	Met	Cys	Cys	
			20					25					30			
Ser	Lys	Cys	Ser	Pro	Gly	Gln	His	Ala	Lys	Val	Phe	Cys	Thr	Lys	Thr	
		35					40					45				
Ser	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Ser	Cys	Glu	Asp	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln	Leu	
	50					55					60					
Trp	Asn	Trp	Val	Pro	Glu	Cys	Leu	Ser	Cys	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	
65					70					75					80	
Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Cys	Thr	Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	
				85					90					95		
Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	
			100					105					110			
Arg	Leu	Cys	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	
		115					120					125				
Arg	Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Val	Cys	Lys	Pro	Cys	Ala	Pro	
	130					135					140					
Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Asp	Ile	Cys	Arg	Pro	His	
145					150					155					160	
Gln	Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala	Ile	Pro	Gly	Asn	Ala	Ser	Met	Asp	Ala	
			165						170					175		
Val	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Val	
			180					185					190			
His	Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Arg	Ser	Gln	His	Thr	Gln	Pro	Thr	
		195					200					205				
Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	Phe	Leu	Leu	Pro	Met	Gly	
	210					215					220					
Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
225					230					235					240	

ES 2 784 238 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly Lys
 465

<210> 14

<211> 731

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 784 238 T3

<400> 14

```

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1           5           10           15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20           25           30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35           40           45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50           55           60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65           70           75           80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85           90           95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100          105          110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115          120          125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
130          135          140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145          150          155          160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
165          170          175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
180          185          190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
195          200          205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly

```

ES 2 784 238 T3

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

ES 2 784 238 T3

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
 465 470 475 480
 Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys
 485 490 495
 Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr Gly Ile Ser
 500 505 510
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile
 515 520 525
 Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe Gln Gly Arg
 530 535 540
 Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
 545 550 555 560
 Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
 565 570 575
 Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr Tyr Asp Met
 580 585 590
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 595 600 605
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val
 610 615 620
 Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr
 625 630 635 640
 Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
 645 650 655
 Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp
 660 665 670
 Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys
 675 680 685
 Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp
 690 695 700
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp
 705 710 715 720
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 725 730

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 15

	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
10	1				5					10					15

<210> 16
 <211> 2193
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 16

	ctgcccgcgc	aggtggcctt	taccccttat	gcccccgagc	ccggcagcac	ctgtcggtg	60
	agagagtact	acgaccagac	cgcccagatg	tgctgcagca	agtgtctctcc	tggccagcat	120
	gccaagggtgt	tctgcaccaa	gaccagcgac	accgtgtgcg	acagctgcga	ggacagcacc	180
	tacacccagc	tgtggaactg	ggtgcccag	tgcttgagct	gcggcagcag	atgcagcagc	240
	gaccaggtgg	aaacccaggc	ctgcaccaga	gagcagaacc	ggatctgcac	ctgtagaccc	300
	ggctgggtact	gcgccctgag	caagcaggaa	ggctgcagac	tctgcgcccc	tctgcggaag	360
	tgagaccccg	gctttggcgt	ggccagaccc	ggcaccgaga	caagcgacgt	ggtctgtaag	420
	ccctgcgctc	ctggcacctt	cagcaacacc	accagcagca	ccgacatctg	cagacccac	480
	cagatctgca	acgtggtggc	catccccggc	aacgccagca	tggatgccgt	ctgcaccagc	540
	actagcccca	ccagaagtat	ggcccctggc	gccgtgcac	tgccccagcc	tgtgtccacc	600
	agaagccagc	acacccagcc	cacccctgag	cctagcaccg	ccccctccac	cagctttctg	660
	ctgcctatgg	gccctagccc	tccagccgag	ggaagcacag	gcgacgagcc	caagagctgc	720
	gacaagaccc	acacctgtcc	cccctgccct	gccctgaac	tgctgggcgg	accagcgtg	780
	ttcctgttcc	ccccaaagcc	caaggacacc	ctgatgatca	gccggacccc	cgaagtgacc	840
	tgcggtggtg	tggacgtgtc	ccacgaggac	cctgaagtga	agttcaattg	gtacgtggac	900
20	ggcgtggaag	tgacacaacgc	caagaccaag	cccagagagg	aacagtacaa	ctccacctac	960

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 1020
 tgcaaggctct ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 1080
 ggccagcccc gcgagcctca ggtgtacaca ctgcccccca gccgggaaga gatgaccaag 1140
 aaccaggtgt ccctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 1200
 tgggagagca atggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc 1260
 gacggctcat tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 1320
 aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1380
 ctgagcctga gccccggaaa gggcgggtggc ggatccggag gtgggggatc tcaggtgcag 1440
 ctggtgcagt ctggcgccga agtgaagaaa cccggctcta gcgtgaaggt gtcctgcaag 1500
 gccagcggcg gcaccttctc cacctacggc atcagctggg tccgccaggc ccctggacag 1560
 ggcctggaat ggatgggagg catcatcccc atcttcgaca ccggcaacag cgcccagagc 1620
 ttccagggca gagtgacct caccgccgac gagagcacct ccaccgccta catggaactg 1680
 agcagcctgc ggagcgagga caccgccgtg tactactgcg ccagaagcag ccggatctac 1740
 gacctgaacc ccagcctgac cgcctactac gacatggacg tgtggggcca gggcaccatg 1800
 gtcacagtgt ctagcggagg cggcggatct ggcggcggag gaagtggcgg gggaggatct 1860
 gccagagcgc tgctgacctc gcccccttct gtgtctgccg cccctggcca gaaagtgacc 1920
 atctcctgca gcggcagcag cagcaacatc ggcaacaact acgtgtcctg gtatcagcag 1980
 ctgcccggca ccgcccctaa gctgctgatc tacgacaaca acaagcggcc cagcggcatc 2040
 cccgaccggt ttagcggcag caagagcggg acttctgcta cactgggcat cacaggcctg 2100
 cagaccggcg acgaggccga ctactactgc ggcacctggg acagcagcct gagcgcttgg 2160
 gtgttcggcg gaggcaccaa gctgacagtg ctg 2193

<210> 17

<211> 735

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 17

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
 20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr

ES 2 784 238 T3

35					40					45					
Ser	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Ser	Cys	Glu	Asp	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln	Leu
50					55					60					
Trp	Asn	Trp	Val	Pro	Glu	Cys	Leu	Ser	Cys	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser
65					70					75					80
Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Cys	Thr	Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys
				85					90					95	
Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys
			100					105					110		
Arg	Leu	Cys	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala
		115					120					125			
Arg	Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Val	Cys	Lys	Pro	Cys	Ala	Pro
	130					135					140				
Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Asp	Ile	Cys	Arg	Pro	His
145					150					155					160
Gln	Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala	Ile	Pro	Gly	Asn	Ala	Ser	Met	Asp	Ala
				165					170					175	
Val	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Val
			180					185					190		
His	Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Arg	Ser	Gln	His	Thr	Gln	Pro	Thr
		195					200					205			
Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	Phe	Leu	Leu	Pro	Met	Gly
	210					215					220				
Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
225					230					235					240
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
				245					250					255	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			260					265					270		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		275					280					285			

ES 2 784 238 T3

Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	290	295	300
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	305	310	315
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	325	330	335
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	340	345	350
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	355	360	365
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	370	375	380
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	385	390	395
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	405	410	415
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	420	425	430
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	435	440	445
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	450	455	460
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	465	470	475
Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	485	490	495
Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Gly	Ile	Ser	500	505	510
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Cys	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Gly	Ile	515	520	525
Ile	Pro	Ile	Phe	Asp	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala	Gln	Ser	Phe	Gln	Gly	Arg	530	535	540

ES 2 784 238 T3

Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
545 550 555 560

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
565 570 575

Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr Tyr Asp Met
580 585 590

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
595 600 605

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
610 615 620

Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly
625 630 635 640

Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn
645 650 655

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
660 665 670

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
675 680 685

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu
690 695 700

Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser
705 710 715 720

Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
725 730 735

<210> 18

<211> 2205

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 18

10

ctgcccgcgc aggtggcctt tacccttat gccccgcagc cgggcagcac ctgtcggtg 60

agagagtact acgaccagac cgcccagatg tgctgcagca agtgctctcc tggccagcat 120

ES 2 784 238 T3

gccaaggtgt tctgcaccaa gaccagcgac accgtgtgcg acagctgcga ggacagcacc 180
tacaccagc tgtggaactg ggtgcccag tgcctgagct gcggcagcag atgcagcagc 240
gaccaggtgg aaaccaggc ctgcaccaga gagcagaacc ggatctgcac ctgtagaccc 300
ggctggtact gcgccctgag caagcaggaa ggctgcagac tctgcgcccc tctgcggaag 360
tgcagacccg gctttggcgt ggccagaccc ggcaccgaga caagcgacgt ggtctgcaag 420
ccctgcgctc ctggcacctt cagcaacacc accagcagca ccgacatctg cagaccccac 480
cagatctgca acgtggtggc catccccggc aacgccagca tggatgccgt gtgcaccagc 540
accagcccca ccagaagtat ggcccctggc gccgtgcac tgcgccagcc tgtgtccacc 600
agaagccagc acaccagcc cacccttag cctagcaccg cccctccac cagctttctg 660
ctgcctatgg gccctagccc tccagccgag ggaagcacag gcgacgagcc caagagctgc 720
gacaagaccc acacctgtcc cccctgccct gccctgaac tgctgggagg acccagcgtg 780
ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 840
tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 900
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa ctccacctac 960
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 1020
tgcaaagtct ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 1080
ggccagcccc gcgagcctca ggtgtacaca ctgcccccca gccggaaga gatgaccaag 1140
aaccaggtgt ccctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 1200
tgaggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc 1260
gacggctcat tcttctgtga cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 1320
aatgtcttca gctgtagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1380
ctgagcctga gccccggaaa gggcggaggc ggatccggag gtgggggatc tcaggtgcag 1440
ctggtgcagt ctggcgccga agtgaagaaa cccggctcta gcgtgaagg gtcttgcaag 1500
gccagcggcg gcaccttctc cacctacggc atcagctggg tccgccaggc ccctggacag 1560
tgtctggaat ggatgggagg catcatcccc atcttcgaca ccggcaacag cgcccagagc 1620
ttccagggca gagtgaccat caccgccgac gagagcacct ccaccgcta catggaactg 1680
agcagcctgc ggagcgagga caccgccgtg tactactgag ccagaagcag ccgatctac 1740
gacctgaacc ccagcctgac cgcctactac gacatggacg tgtggggcca gggcaccatg 1800
gtcacagtgt ctagcggagg cggaggcagc ggaggtggtg gatctggtgg cggaggaaagt 1860
ggcggcggag gctctcagag cgtgctgacc cagccccctt ctgtgtctgc cgcccctggc 1920
cagaaagtga ccatctcctg cagcggcagc agcagcaaca tcggcaacaa ctacgtgtcc 1980

tggtatcagc agctgcccgg caccgcccct aagctgctga tctacgacaa caacaagcgg 2040
cccagcggca tccccgaccg gtttagcggc agcaagagcg ggacttctgc tacactgggc 2100
atcacaggcc tgcagaccgg cgacgaggcc gactactact gcggcacctg ggacagcagc 2160
ctgagcgctt ggggtgttcgg ctgcggcacc aagctgacag tgctg 2205

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 19

10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 20

<211> 215

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 20

20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ile Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

ES 2 784 238 T3

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 21
<211> 645
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

10 <400> 21

gaaatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgagctgca gagccagcca gagcgtgtac tcctacctgg cttggtatca gcagaagccc 120

ggccaggccc ccagactgct gatctacgac gccagcaacc gggccatcgg catccctgcc 180

agattttctg gcagcggcag cggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctggaaccc 240

gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cggagcaact ggccccctt caccttcggc 300

cctggcacca aggtggacat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 22
 <211> 724
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 22

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
20          25          30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ser Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100         105         110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115         120         125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130         135         140

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165         170         175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180         185         190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

```

10

ES 2 784 238 T3

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

ES 2 784 238 T3

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 450 455 460
 Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 465 470 475 480
 Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser
 485 490 495
 Thr Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu
 500 505 510
 Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln
 515 520 525
 Ser Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr
 530 535 540
 Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 545 550 555 560
 Tyr Cys Ala Arg Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr
 565 570 575
 Ala Tyr Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
 580 585 590
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 595 600 605
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
 610 615 620
 Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
 625 630 635 640
 Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
 645 650 655
 Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly
 660 665 670
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu
 675 680 685
 Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
 690 695 700

ES 2 784 238 T3

Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys
705 710 715 720

Leu Thr Val Leu

<210> 23

<211> 2172

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 23

10

caggtgcagc	tggtggaaag	cggcggaggc	gtggtgcagc	ccggcagaag	cctgagactg	60
agctgcgctg	ccagcgggctt	catcttcagc	agctacgcca	tgcactgggt	ccgccaggcc	120
cctggcaacg	gactggaatg	ggtggccttc	atgagctacg	acggcagcaa	caagaagtac	180
gccgacagcg	tgaagggccg	gttcaccatc	agccgggaca	acagcaagaa	caccctgtac	240
ctgcagatga	acagcctgcg	ggctgaggac	accgccgtgt	actactgcgc	cagagaccga	300
ggcatcagtg	ctggcggcaa	ctactactac	tacggcatgg	acgtgtgggg	ccagggcacc	360
accgtgaccg	tgtctagcgc	gtcgaccaag	ggcccatccg	tcttccccct	ggcaccctcc	420
tccaagagca	cctctggggg	cacagcggcc	ctgggctgcc	tggtcaagga	ctacttcccc	480
gaaccggtga	cgggtgtcctg	gaactcaggc	gctctgacca	gcggcgctgca	caccttcccg	540
gctgtcctac	agtcctcagg	actctactcc	ctcagcagcg	tggtgaccgt	gccctccagc	600
agcttgggca	cccagacctt	catctgcaac	gtgaatcaca	agcccagcaa	caccaagggtg	660
gacaagagag	ttgagcccaa	atcttgtgac	aaaactcaca	catgcccacc	gtgcccagca	720
cctgaactcc	tgggggggacc	gtcagtcttc	ctcttcccc	caaaacccaa	ggacaccctc	780
atgatctccc	ggaccctga	ggtcacatgc	gtggtggtgg	acgtgagcca	cgaagaccct	840
gaggtcaagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	ataatgcaa	gacaaagccg	900
cgggaggagc	agtacaacag	cacgtaccgt	gtggtcagcg	tcctcaccgt	cctgcaccag	960
gactggctga	atggcaagga	gtacaagtgc	aaggtctcca	acaaagccct	cccagcccc	1020
atcgagaaaa	ccatctccaa	agccaaagg	cagccccgag	aaccacaggt	ctacaccctg	1080
cccccatccc	gggaggagat	gaccaagaac	caggctcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	1140
ttctatccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	1200
aagaccacgc	ctcccgctgct	ggactccgac	ggctccttct	tcctctatag	caagctcacc	1260
gtggacaaga	gcaggtggca	gcaggggaac	gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggct	1320

ES 2 784 238 T3

```

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaagg cggaggggga      1380
tccggcgggag ggggctctca ggtgcagctg gtgcagtctg gcgccgaagt gaagaaaccc      1440
ggctctagcg tgaaggtgtc ctgcaaggcc agcggcggca ccttctccac ctacggcatc      1500
agctgggtcc gccaggcccc tggacagtgt ctggaatgga tgggcggcat catccccatc      1560
ttcgacaccg gcaacagcgc ccagagcttc cagggcagag tgaccatcac cgccgacgag      1620
agcacctcca ccgcctacat ggaactgagc agcctgcgga gcgaggacac cgccgtgtac      1680
tactgcgcca gaagcagccg gatctacgac ctgaacccca gcctgaccgc ctactacgac      1740
atggacgtgt ggggccaggg caccatggtc acagtgtcta gcggaggcgg aggcagcgga      1800
ggtggtggat ctggtggcgg aggaagtggc ggcggaggct ctgagagcgt gctgaccagg      1860
cccccttctg tgtctgccgc ccctggccag aaagtgacca tctcctgcag cggcagcagc      1920
agcaacatcg gcaacaacta cgtgtcctgg tatcagcagc tgcccggcac cgcccctaag      1980
ctgctgatct acgacaacaa caagcggccc agcggcatcc ccgaccggtt tagcggcagc      2040
aagagcggga cttctgctac actgggcatc acaggcctgc agaccggcga cgaggccgac      2100
tactactgcg gcacctggga cagcagcctg agcgcttggg tgttcggctg cggcaccaag      2160
ctgacagtgc tg                                          2172

```

<210> 24

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 24

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Trp Phe Gly
20 25 30

Ala Phe Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Leu Thr Asn Leu Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

ES 2 784 238 T3

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25

<211> 384

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

10 <400> 25

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctggagg caccttctgg ttcggcgcggt tcacctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag gacttgagtg gatgggaggg attattccta tcttcgggtt gacgaacttg 180
gcacagaact tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcttgag atctgaagac acggccgtat attattgtgc acgttcaagt 300
cgtatctacg atctgaaccc gtcctgacc gcctactacg atatggatgt ctggggccag 360
gggacaatgg tcaccgtctc gagt 384

<210> 26

<211> 110

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 26

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ES 2 784 238 T3

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 27

<211> 330

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

10 <400> 27

cagtctgtgc tgactcagcc gccatcagtg tctgcgggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc cgacattggg aataattatg tatcgtggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgcttgggtg 300
ttcggcgag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 28

<211> 126

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 28

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

ES 2 784 238 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ser Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 29

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 29

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ile Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 30

<211> 128

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 30

ES 2 784 238 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Ala Asn Arg Gln Ala Val Pro Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 31

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 31

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Met Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ES 2 784 238 T3

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 32

<211> 128

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 32

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe Thr Ser Gly Leu Ala Pro Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 33

<211> 110

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 33

ES 2 784 238 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 34

<211> 128

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 34

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Ala Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala His
65 70 75 80

ES 2 784 238 T3

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp His His Ile Gln Lys Gly Gly Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 35

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 35

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 36

<211> 112

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 36

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

ES 2 784 238 T3

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr	20	25	30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	35	40	45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	65	70	75
Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Tyr His Thr Ile Ala Tyr Tyr Asp	100	105	110

<210> 37

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 37

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln	1	5	10	15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn	20	25	30	
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	35	40	45	
Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser	50	55	60	
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln	65	70	75	80
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu	85	90	95	
Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	100	105	110	

<210> 38
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 38

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	20	25	30	
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Asp	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala	Gln	Ser	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Lys	Val	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Ser	Ser	Ser	Arg	Ile	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Pro	Gly	Met	Arg	Pro	Tyr	100	105	110	
Tyr	Asp	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	115	120	125	

10 <210> 39
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 39

Gln	Ala	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Gln	1	5	10	15
Lys	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Asn	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Asn	Asn	20	25	30	

20

ES 2 784 238 T3

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Leu Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 40

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 40

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe Asn Ser Ser Leu Ile Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 41

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 41

5

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Ser Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 42

<211> 128

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 42

15

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

Thr Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ES 2 784 238 T3

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 43

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 43

10

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 44

<211> 128

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 44

ES 2 784 238 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe Glu Pro Ser Leu Ile Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 45

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 45

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

ES 2 784 238 T3

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 46

<211> 128

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 46

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 47

<211> 110

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 784 238 T3

<400> 47

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 48

5 <211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 48

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

ES 2 784 238 T3

65		70		75		80									
Met	Glu	Val	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Ser	Ser	Ser	Arg	Ile	Tyr	Asp	Leu	Asn	Pro	Ser	Leu	Thr	Ala	Tyr
			100					105					110		
Tyr	Asp	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120					125			

<210> 49

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 49

Gln	Ala	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Gln
1				5					10					15	
Lys	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Asn	Asn
			20					25					30		
Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Asp	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln
65					70					75					80
Thr	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Thr	Trp	Asp	Ser	Ser	Leu
				85					90					95	
Ser	Ala	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu		
			100					105					110		

<210> 50

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 50

ES 2 784 238 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 51

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 51

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

ES 2 784 238 T3

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Gly Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 52

<211> 128

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 52

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Ser Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe Arg Thr Leu Tyr Ser Thr Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 53

<211> 110

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 53

ES 2 784 238 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Ala Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 54

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 54

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

ES 2 784 238 T3

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 55

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 55

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Glu Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Thr Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 56

<211> 128

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 56

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

ES 2 784 238 T3

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 57

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 57

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

15

<210> 58
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 58

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ala Tyr
          20          25          30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asn Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
          50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
          100          105          110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
          115          120          125
    
```

<210> 59
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 59

```

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1          5          10          15

Lys Val Thr Val Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
    
```

ES 2 784 238 T3

20

25

30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 60

<211> 128

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 60

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly His Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 61

<211> 110

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 61

Gln	Ala	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Gln	1	5	10	15
Lys	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Asn	Asn	20	25	30	
Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	35	40	45	
Ile	Tyr	Asp	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	50	55	60	
Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	65	70	75	80
Thr	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Thr	Trp	Asp	Ser	Ser	Leu	85	90	95	
Ser	Ala	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	100	105	110			

<210> 62

10 <211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

15 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 62

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	20	25	30	
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Val	Trp	Ile	35	40	45	

ES 2 784 238 T3

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Met Ile Ser Ser Leu Gln Pro Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 63

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 63

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Ala Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 64

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 784 238 T3

<400> 64

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
          20          25          30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
          50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe His Leu Ala Asn Lys Gly Tyr
          100          105          110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

<210> 65

5 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 65

```

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1          5          10          15

Lys Ala Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
          20          25          30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
          35          40          45

```

ES 2 784 238 T3

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Asp Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 66

<211> 128

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 66

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp His His Asn His Val Gly Gly Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 67

<211> 110

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 784 238 T3

<400> 67

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Gly Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 68

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 68

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

Ser Ala Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

ES 2 784 238 T3

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 69

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 69

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
100 105

<210> 70

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 70

ES 2 784 238 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 71

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 71

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Glu Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

ES 2 784 238 T3

65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 72

<211> 128

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 72

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Ala Thr Thr Gly Leu Thr Pro Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 73

<211> 110

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 73

ES 2 784 238 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Arg
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 74

<211> 128

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 74

10

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Tyr Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Arg Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Met Val Ser Thr Leu Ile Pro Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 75
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 75

Gln	Ala	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Gln	1	5	10	15
Lys	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Asn	Asn	20	25	30	
Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	35	40	45	
Ile	Tyr	Asp	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	50	55	60	
Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	65	70	75	80
Thr	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Thr	Trp	Asp	Ser	Ser	Leu	85	90	95	
Ser	Ala	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	100	105	110			

<210> 76
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 76

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

ES 2 784 238 T3

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Ala His Leu Gln Ala Tyr Tyr Asp
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 77

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 77

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Arg Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

15 <210> 78

<211> 128

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 78

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
                20           25           30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
          35           40           45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
          50           55           60

Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Ala His Leu Asn His His Gly Tyr
          100          105          110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

<210> 79

10 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

15 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 79

```

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1           5           10           15

```

ES 2 784 238 T3

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 80

<211> 128

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 80

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Ser Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

15 <210> 81

<211> 110

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 81

Gln	Ala	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Gln	1	5	10	15
Lys	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Thr	Gly	Asn	Asn	20	25	30	
Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Ser	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	35	40	45	
Ile	Tyr	Asp	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	50	55	60	
Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	65	70	75	80
Thr	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Thr	Trp	Asp	Ser	Ser	Leu	85	90	95	
Ser	Ala	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	100	105	110			

<210> 82

10 <211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

15 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 82

Glu	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	20	25	30	
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile				

ES 2 784 238 T3

35

40

45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe Asn Ser Ala Leu Ile Ser Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 83

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 83

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
100 105

<210> 84

<211> 125

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

ES 2 784 238 T3

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 84

Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ala	Tyr	His	20	25	30	
Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Arg	Phe	50	55	60	
Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Ser	Ala	Asp	Tyr	Val	Trp	Gly	Ser	Tyr	Arg	Pro	Asp	Trp	Tyr	Phe	100	105	110	
Asp	Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	115	120	125				

5 <210> 85
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 85

Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	1	5	10	15
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	20	25	30	
Thr	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Arg	Leu	Pro	Gly	Ala	Ala	Pro	Gln	Leu	Leu	35	40	45	

ES 2 784 238 T3

Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 86

<211> 125

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 86

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Phe Ala Tyr His
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ala Asp Tyr Ala Trp Glu Ser Tyr Gln Pro Pro Gln Ile Asn
100 105 110

Gly Val Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 87

<211> 110

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 87

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met
35 40 45

Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Asp Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Glu Phe Phe Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 88

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 88

Phe Gly Ala Phe Thr
1 5

<210> 89

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

20 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 89

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Leu Thr Asn Leu Ala Gln Asn Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 90

25 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 90

5
 Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr Tyr Asp
 1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 91
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 91

15
 Ser Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 92
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 92

25
 Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 93
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 93

35
 Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val
 1 5 10

<210> 94
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 94

ES 2 784 238 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
 100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 95

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 95

ES 2 784 238 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 96

<211> 125

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 96

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

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

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ala Asp Tyr Val Trp Glu Ser Tyr His Pro Ala Thr Ser Leu
100 105 110

Ser Leu Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 97

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 97

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Pro Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met
35 40 45

Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Asp Ile Ser Glu Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Glu Phe Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 98

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

20 <400> 98

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 99

<211> 2205

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 99

ctgcccgcgc	aggtggcctt	taccoccttat	gctcctgagc	ccggctctac	ctgccggctg	60
agagagtact	acgaccagac	cgcccagatg	tgctgctcca	agtgctctcc	tgccagcac	120
gccaaggtgt	tctgcaccaa	gacctccgat	accgtgtgcg	actcctgcga	ggactccacc	180
tacaccagc	tgtggaactg	ggtgcccag	tgctgtcct	gcggctccag	atgttcctcc	240
gaccaggtgg	aaacccaggc	ctgcaccaga	gagcagaacc	ggatctgcac	ctgtcggcct	300
ggctggtact	gcgcccgtc	taagcaggaa	ggctgcagac	tgtgcgcccc	tctgcggaag	360
tgtagacctg	gctttggcgt	ggccagaccc	ggcaccgaga	catctgatgt	cgtgtgcaag	420
ccttgcgccc	ctggcacctt	ctccaacacc	acctcctcca	ccgacatctg	ccggcctcac	480
cagatctgca	acgtggtggc	catccctggc	aacgcctcta	tggacgccgt	gtgcacctct	540
acctcccca	ccagaagtat	ggcccctggc	gctgtgcac	tgcccagcc	tgtgtctacc	600
agatcccagc	acacccagcc	cacccctgag	ccttctaccg	ccccttctac	cagcttcctg	660
ctgcctatgg	gccctagccc	tctgctgag	ggatctacag	gcgacgagcc	caagtccctg	720
gacaagaccc	acacctgtcc	cccttgctct	gcccctgaac	tgctgggcgg	accttcctgt	780
ttcctgttcc	ccccaaagcc	caaggacacc	ctgatgatca	gccggacccc	tgaagtgacc	840
tgctggtgg	tggatgtgtc	ccacgaggat	cccgaagtga	agttcaattg	gtacgtggac	841
ggcgtggaag	tgacaacgc	caagaccaag	cccagagagg	aacagtacaa	ctccacctac	960
cgggtggtgt	ccgtgctgac	cgtgctgcac	caggattggc	tgaacggcaa	agagtacaag	1020
tgcaaggtgt	ccaacaaggc	cctgcctgcc	cccacgaaa	agaccatctc	caaggccaag	1080
ggccagcccc	gggaaccca	ggtgtacaca	ctgcccccta	gccgggaaga	gatgaccaag	1140
aaccaggtgt	ccctgacctg	tctcgtgaag	ggcttctacc	cctccgatat	cgcctggaa	1200
tgggagtcca	acggccagcc	tgagaacaac	tacaagacca	ccccccctgt	gctggactcc	1260
gacggctcat	tcttcctgta	ctccaagctg	acagtggaca	agtcccgtg	gcagcagggc	1320
aacgtgttct	cctgctccgt	gatgcacgag	gccctgcaca	accactacac	ccagaagtcc	1380
ctgtccctga	gccctggaaa	aggcggcgga	ggatctggcg	gaggcggatc	tcaggtgcag	1440
ctggtgcagt	ctggcgtga	agtgaagaaa	cccggctcct	ccgtgaagg	gtcctgcaag	1500
gcttctggcg	gcaccttctc	tacctacggc	atctcctggg	tgcgacaggc	ccctggccag	1560
tgctggaat	ggatgggcgg	catcatcccc	atcttcgaca	ccggcaactc	cgcccagagc	1620

ES 2 784 238 T3

ttccagggca	gagtgaccat	caccgccgac	gagtctacct	ccaccgccta	catggaactg	1680
tcctccctgc	ggagcgagga	caccgccgtg	tactactgcg	cccggtcctc	tcggatctac	1740
gacctgaacc	cttccctgac	cgcctactac	gacatggacg	tgtggggcca	gggcacaatg	1800
gtcaccgtgt	catctggtgg	tggcggctct	ggtggcggag	gaagtggggg	agggggttct	1860
gggggggggag	gatctcagtc	tgtgctgacc	cagcctcctt	ccgtgtctgc	tgccccaggc	1920
cagaaagtga	caatctcctg	cagcggctcc	agctccaaca	tcggcaacaa	ctacgtgtcc	1980
tggtatcagc	agctgcccgg	caccgctccc	aaactgctga	tctacgataa	caacaagcgg	2040
ccctccggca	tccccgacag	attctccggc	tctaagtccg	gcacctctgc	caccctgggc	2100
atcaccggac	tgcagacagg	cgacgaggcc	gactactact	gtggcacctg	ggactcctcc	2160
ctgtccgctt	gggtgttcgg	ctgcggcacc	aaactgactg	tgctg		2205

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión que comprende un dominio antagonista del NGF y un dominio antagonista del TNF α , en la que el dominio antagonista del NGF es un fragmento scFv anti-NGF, y el dominio antagonista del TNF α comprende un fragmento de TNFR α soluble de unión a TNF α ; en la que el dominio antagonista de TNF α comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a los aminoácidos 1 a 235 de la SEQ ID NO: 13; en la que el fragmento scFv anti-NGF comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94 y un dominio VL de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95, y en la que el fragmento scFv anti-NGF está estabilizado mediante la introducción del enlace disulfuro entre cadenas (estabilizado por SS).
2. La molécula de unión de la reivindicación 1, en la que el fragmento scFv anti-NGF comprende, desde el extremo terminal N al terminal C, un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94, una secuencia enlazadora de 20 aminoácidos (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19), y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95.
3. La molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el antagonista del TNF α comprende un fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α fusionado a un dominio Fc de inmunoglobulina.
4. La molécula de unión de la reivindicación 3, en la que el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG1 humano.
5. La molécula de unión de la reivindicación 4, en la que el dominio Fc de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a los aminoácidos 236 a 467 de la SEQ ID NO: 13.
6. La molécula de unión de la reivindicación 1, en la que el antagonista del TNF α comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 13.
7. La molécula de unión de la reivindicación 1, en la que la molécula de unión comprende una proteína de fusión que comprende el antagonista del NGF fusionado al antagonista del TNF α a través de un enlazador.
8. La molécula de unión de la reivindicación 7, en la que la molécula de unión comprende un homodímero de la proteína de fusión.
9. La molécula de unión de la reivindicación 8, en la que el antagonista del NGF es un dominio scFv anti-NGF y el antagonista del TNF α es un fragmento de TNFR-2 soluble de unión a TNF α fusionado en su extremo terminal carboxilo a un dominio Fc de inmunoglobulina a través de un enlazador.
10. La molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la molécula de unión comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende, desde el extremo terminal N al extremo terminal C, un fragmento de TNFR-2 de unión a TNF α que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia correspondiente a los aminoácidos 1-235 de la SEQ ID NO: 13, un dominio IgG1Fc humano, una secuencia enlazadora de 10 aminoácidos (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 98), un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94, una secuencia enlazadora de 20 aminoácidos (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19) y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95.
11. La molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la molécula de unión comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende, desde el extremo terminal N al extremo terminal C, un fragmento de TNFR-2 de unión a TNF α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, un dominio IgG1Fc humano, una secuencia enlazadora de 10 aminoácidos (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 98), un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94, una secuencia enlazadora de 20 aminoácidos (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19), y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95.
12. La molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la molécula de unión comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.
13. La molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la molécula de unión comprende un homodímero de un polipéptido de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.
14. Un polinucleótido aislado que codifica la molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
15. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 14 asociado operativamente con un promotor.
16. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 15.
17. Una composición que comprende la molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

18. La composición de la reivindicación 17 para su uso en el tratamiento del dolor en un sujeto.

FIG. 1A

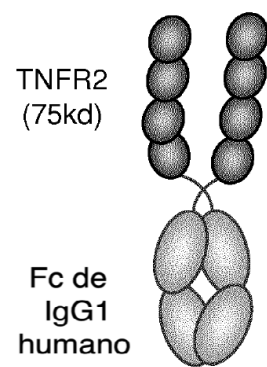


FIG. 1B

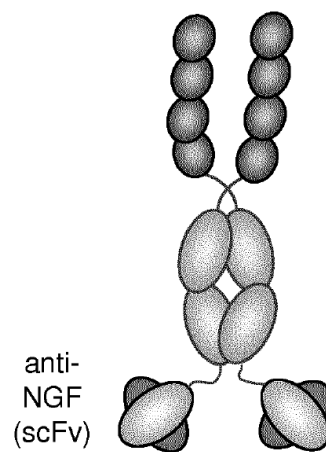


FIG. 2A

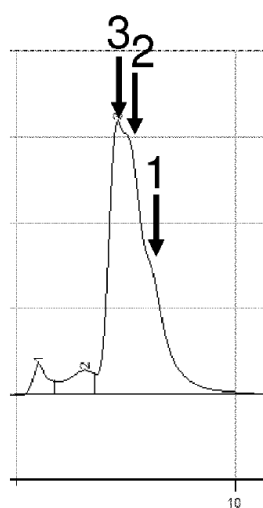


FIG. 2B

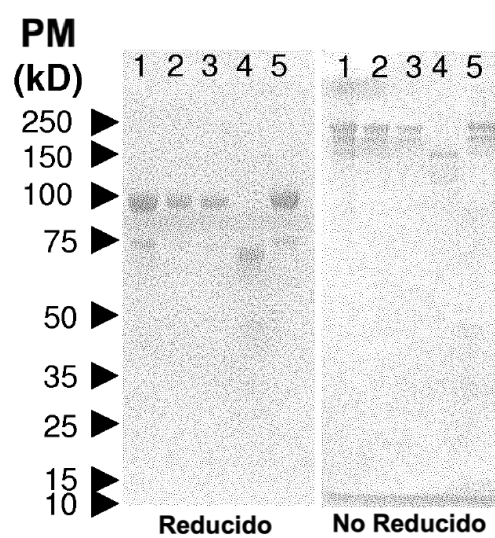


FIG. 3A

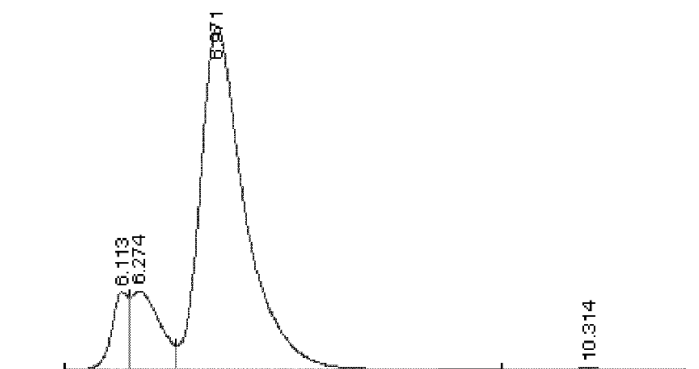


FIG. 3B

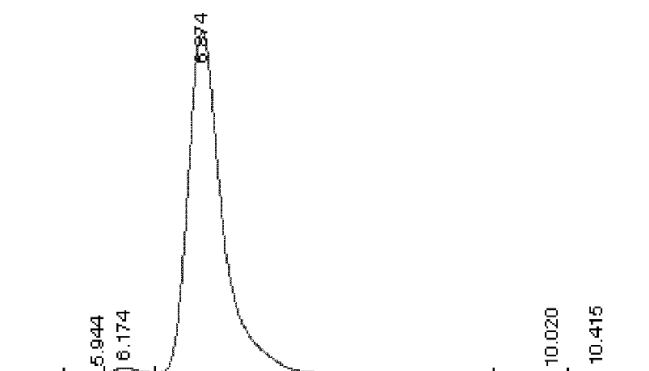


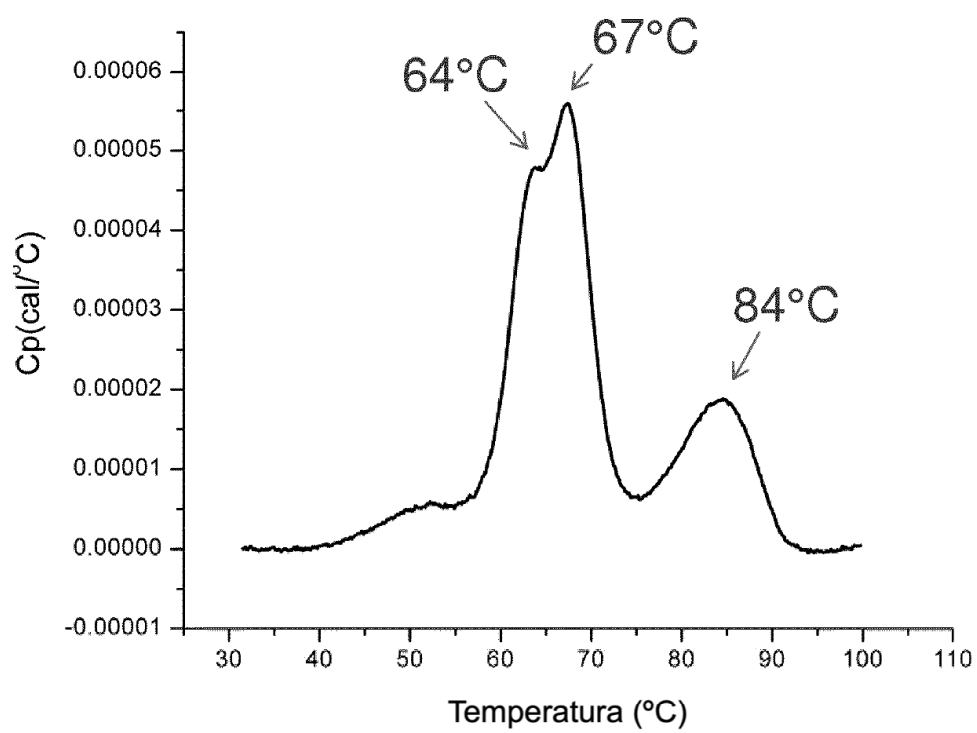
FIG. 4

Fig.5A

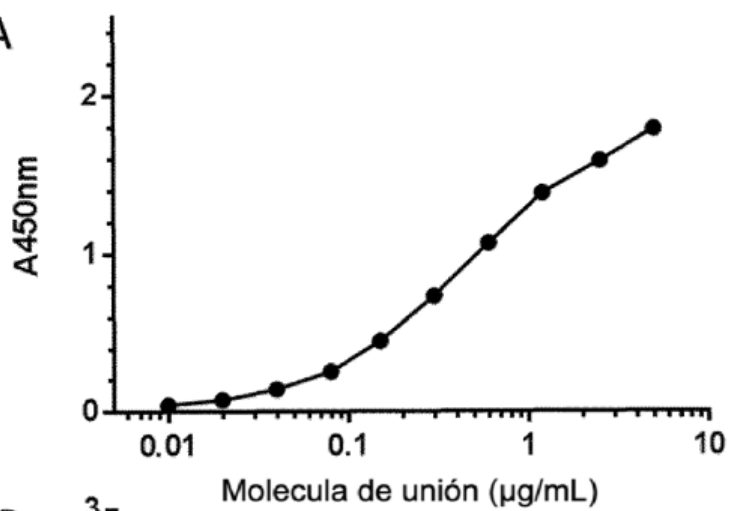


Fig. 5B

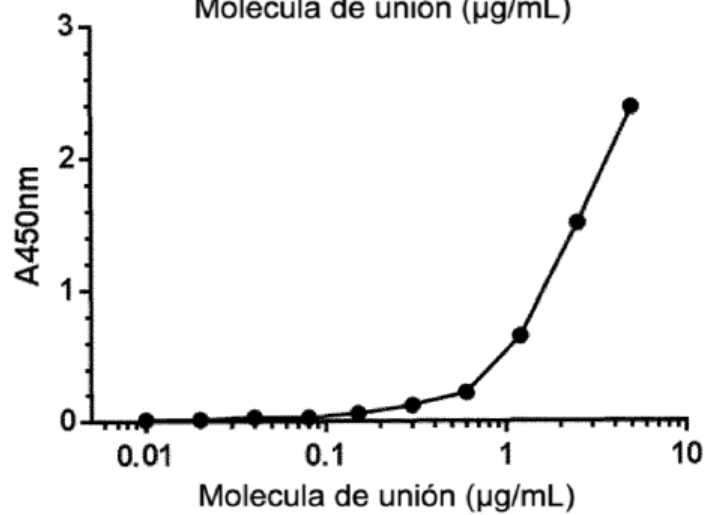


Fig. 5C

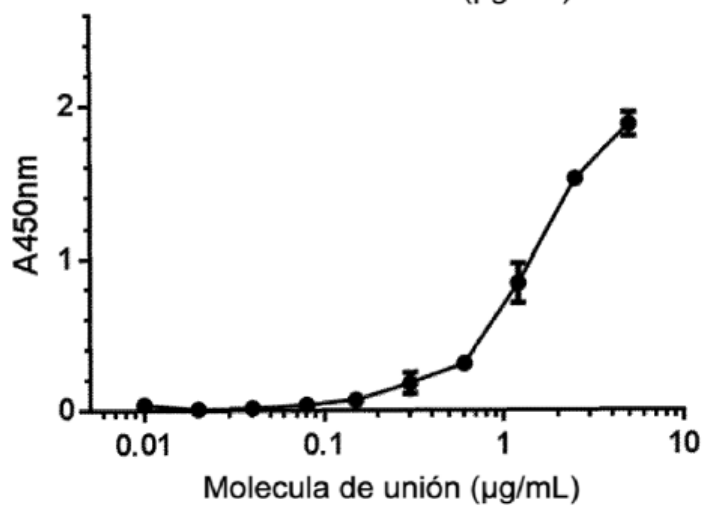


FIG. 6

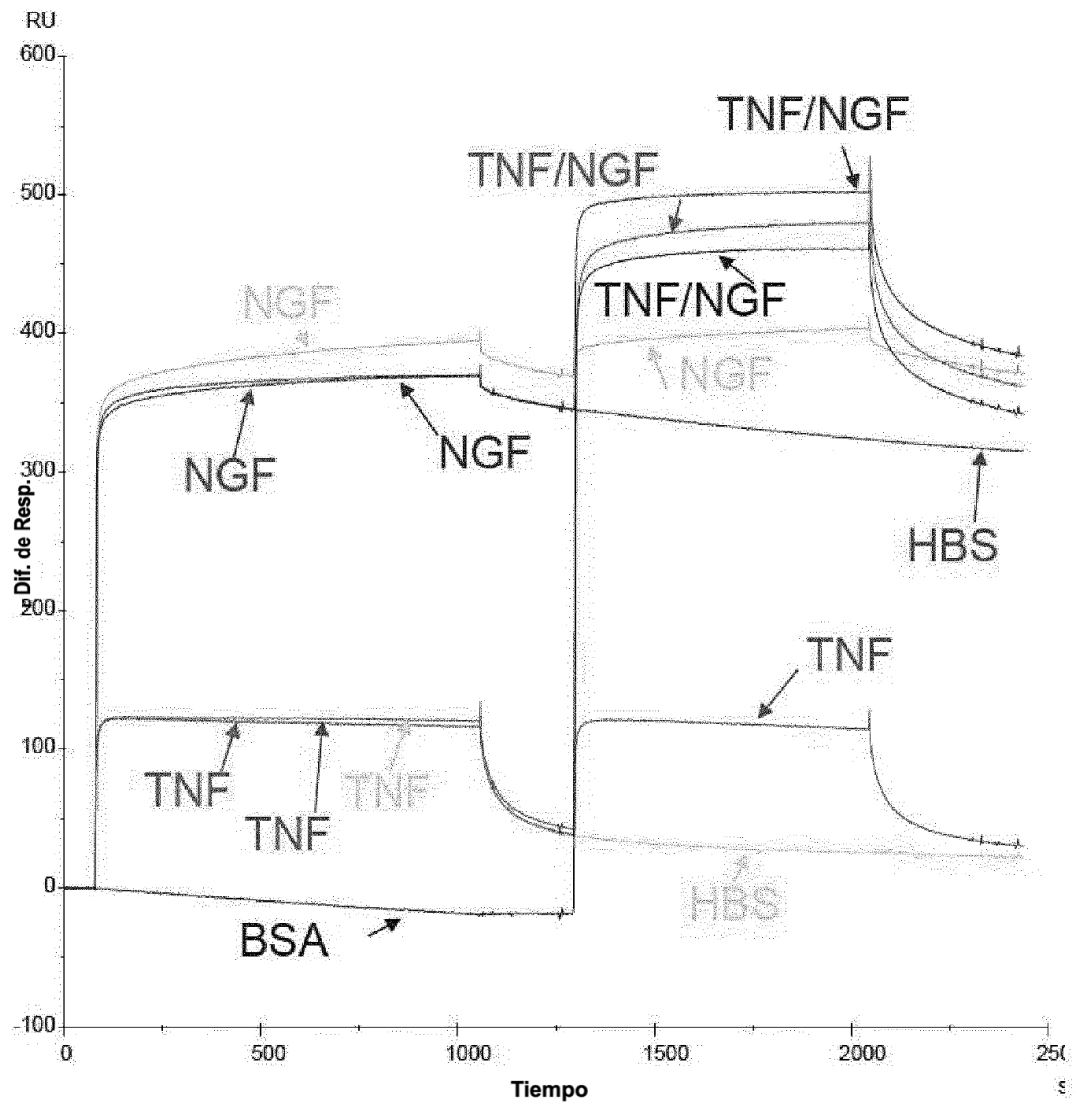


FIG. 7A

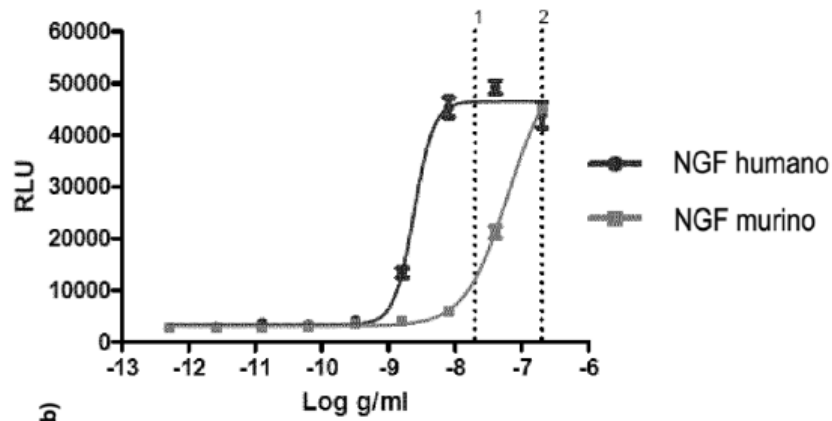


FIG. 7B

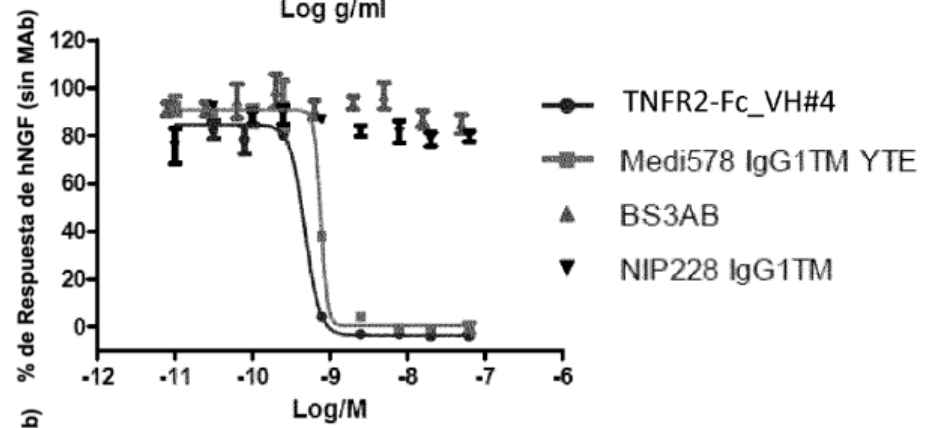


FIG. 7C

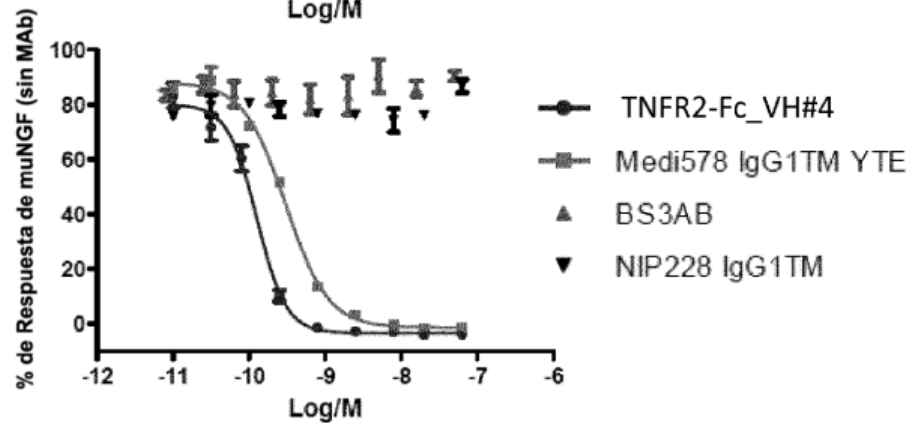
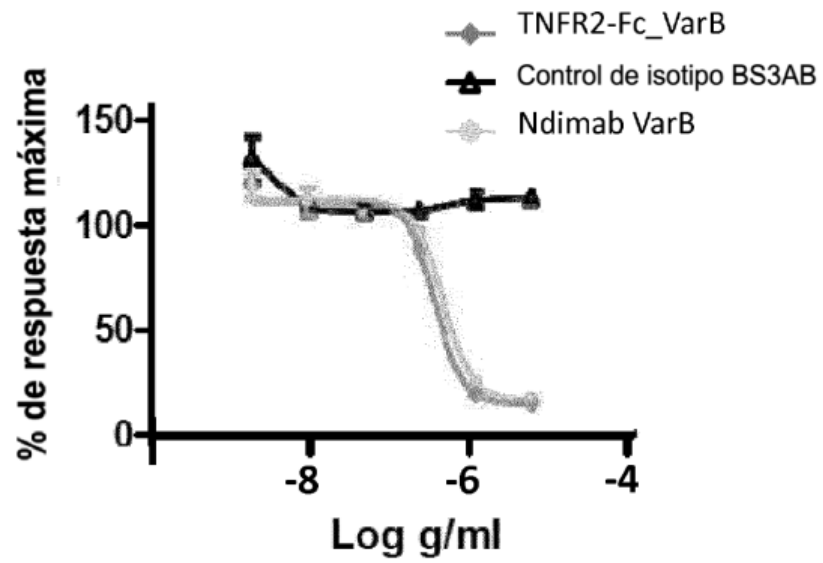
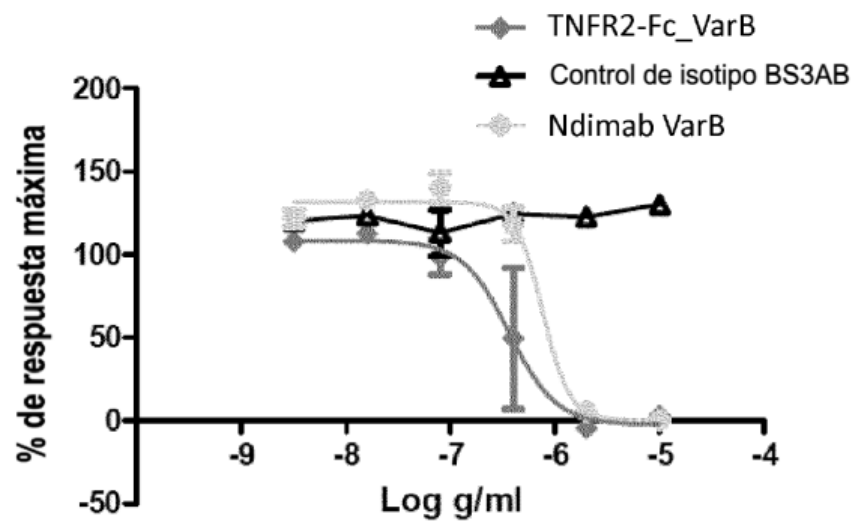


FIG. 7D



	TNFR2-Fc_VarB	ndimab VarB
IC50	3.134e-007	3.934e-007

FIG. 7E



	TNFR2-Fc_VarB	ndimab VarB
IC50	3.642e-007	7.602e-007

FIG. 8A

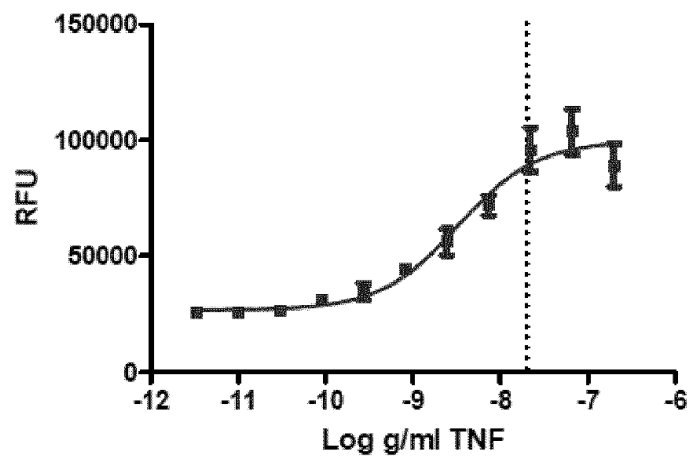


FIG. 8B

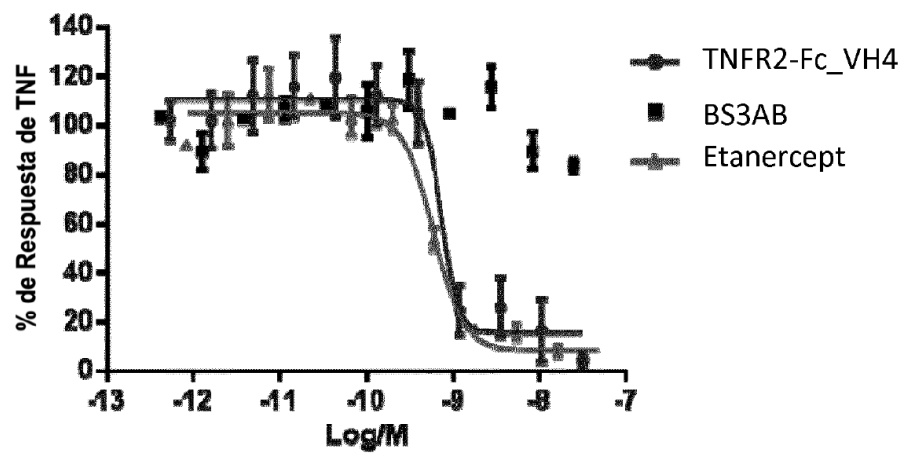
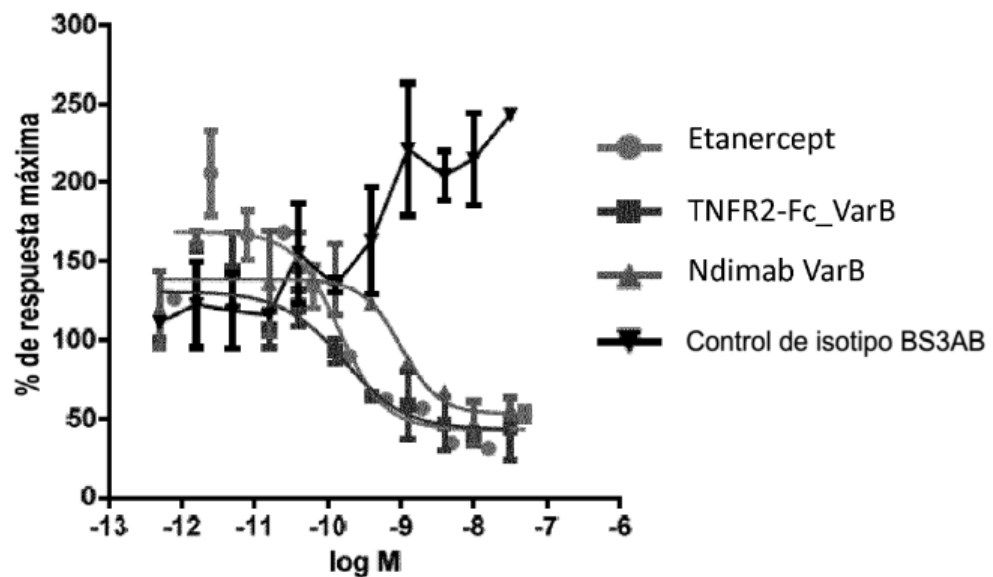
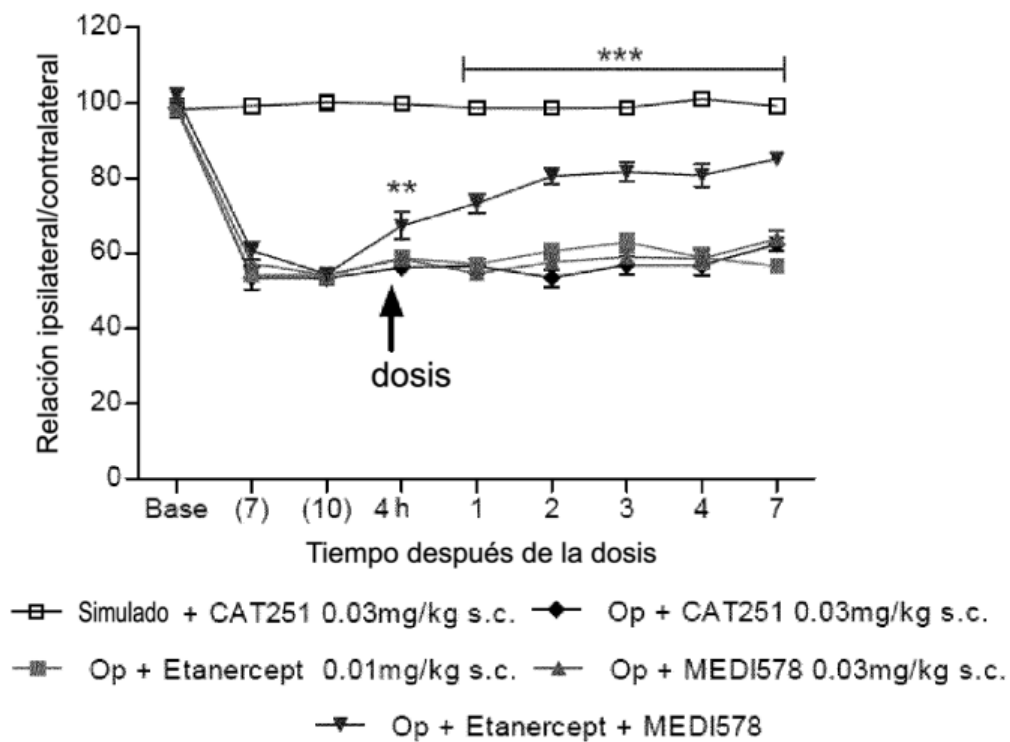


FIG. 8C



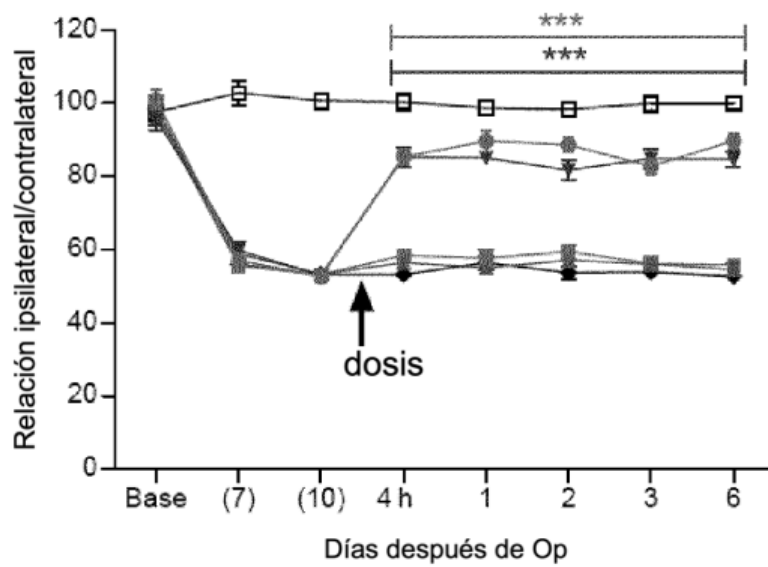
	Etanercept	TNFR2-Fc_VarB	ndimab VarB
IC50	1.444e-010	1.652e-010	1.004e-009

FIG. 9



N=9 por grupo. Datos analizados utilizando ANOVA de dos vías con tiempo y tratamiento como factores dependientes. Significancia estadística posterior obtenida usando la prueba Post Hoc de Bonferroni
 ***p<0,001 para Op + control CAT251

FIG. 10A



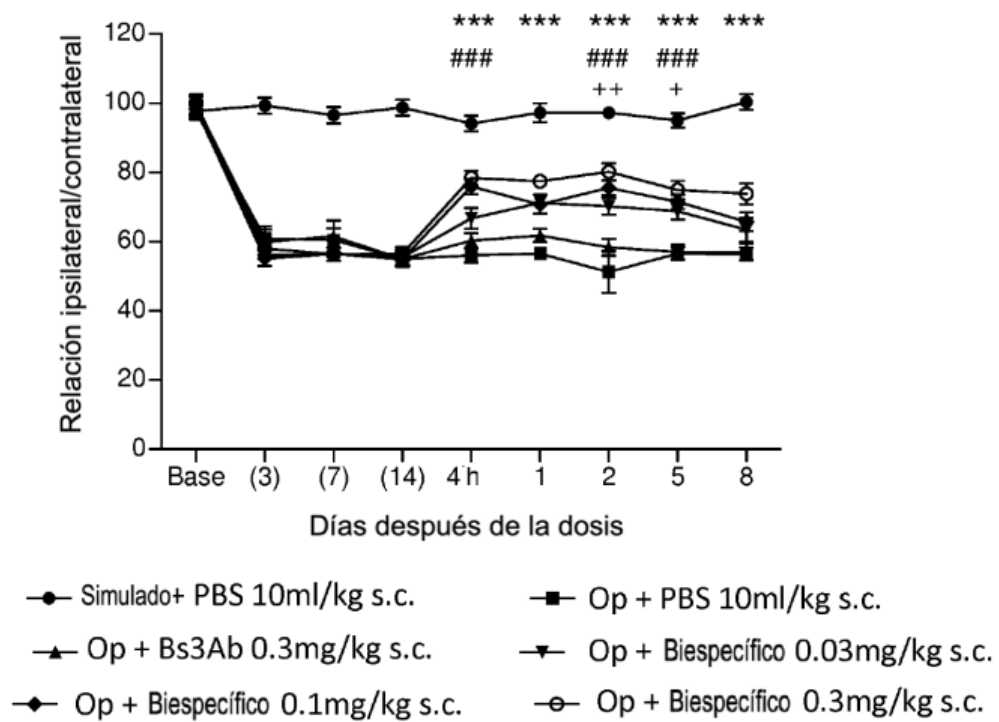
—□— Simulado + Iso 0.03mg/kg s.c. —◆— Op + Iso 0.03mg/kg s.c.

—■— Op + Etanercept 0.01mg/kg s.c. —▲— Op + MEDI578 0.03mg/kg s.c.

—▼— Op + Biespecífico 0.01mg/kg s.c. —●— Op + Biespecífico 0.03mg/kg s.c.

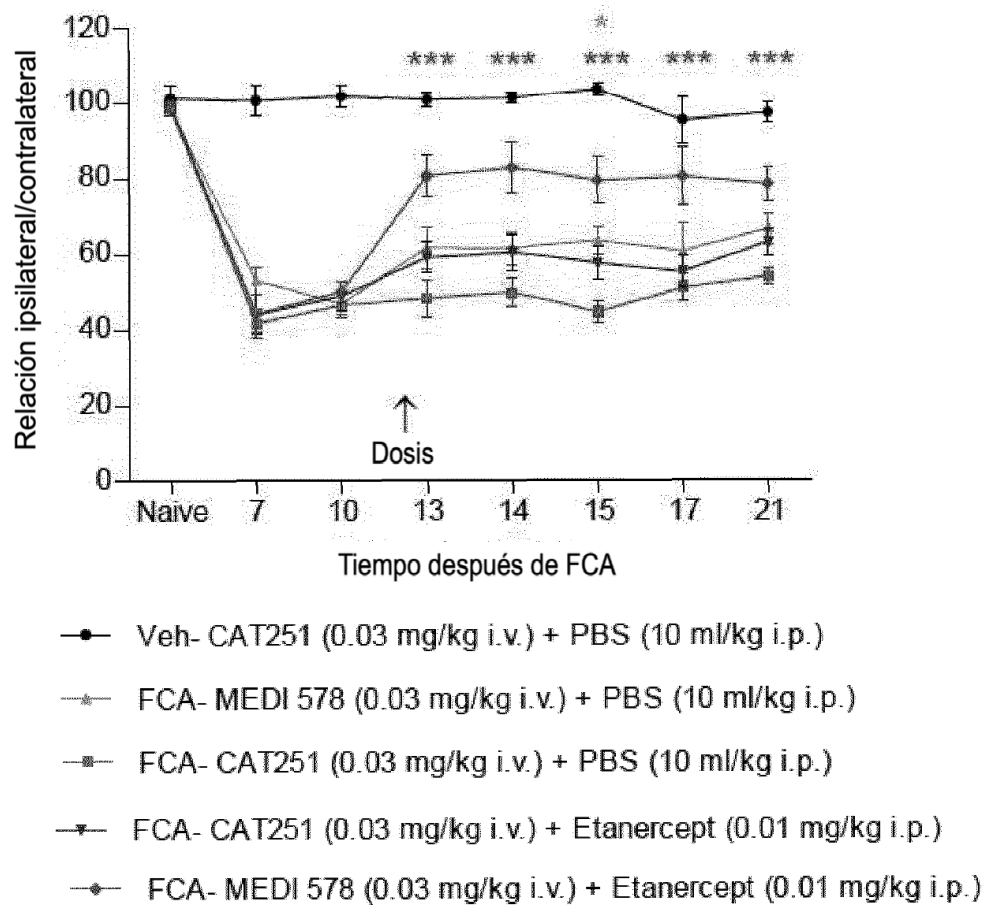
N=10 por grupo. Datos analizados utilizando ANOVA de dos vías con tiempo y tratamiento como factores dependientes. Significancia estadística posterior obtenida usando la prueba Post Hoc de Bonferroni ***
p<0.001 vs Isotipo biespecífico (0.03mg/kg s.c.)

FIG. 10B



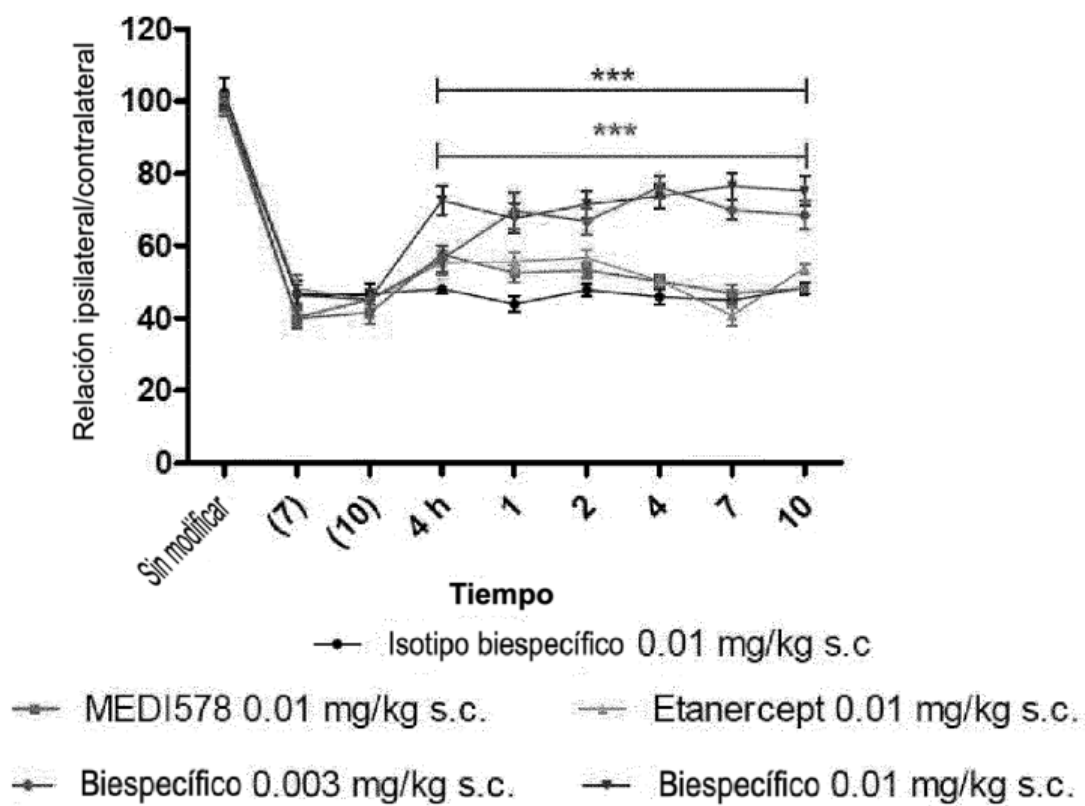
Datos analizados usando análisis de dos vías de la varianza seguido por la prueba post hoc de Bonferroni según sea conveniente.

+ $P < 0.05$; ++ $P < 0.01$ PNL + Biespecífico (0.03mg/kg sc); ### $P < 0.01$ PNL + Biespecífico (0.1mg/kg sc); *** $P < 0.001$ PNL + Biespecífico (0.3mg/kg sc) todo vs PNL + R347

FIG. 11

N=9/10 por grupo. Datos analizados usando ANOVA de dos vías seguido por la prueba post-hoc de Bonferroni. * $P > 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Veh -CAT-251 (0.03 mg/kg i.v.) + PBS (10ml/kg i.p.)

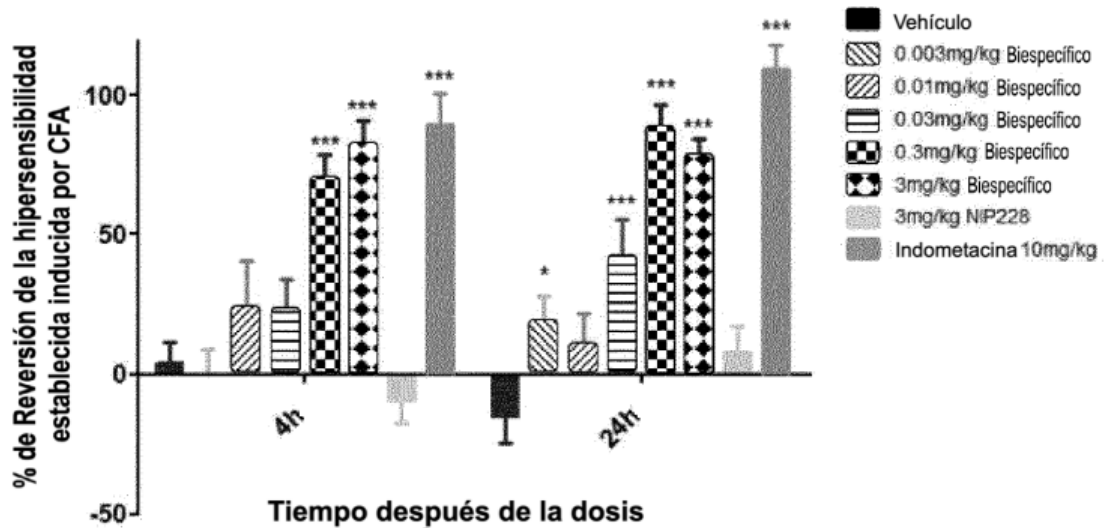
FIG. 12



Datos analizados utilizando ANOVA de dos vías con tiempo y tratamiento como factores dependientes.

Significancia estadística posterior obtenida usando la prueba Post Hoc de Bonferroni

*** $P < 0.001$ vs Isotipo biespecífico (0.01 mg/kg s.c.) n= 9-10

FIG. 13

Análisis estadístico - Medidas repetidas ANOVA, seguido por una prueba de comparación planificada, usando InVivoStat.
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ Reversión significativa de la hiperalgesia cuando se compara con vehículo en cada punto de tiempo.

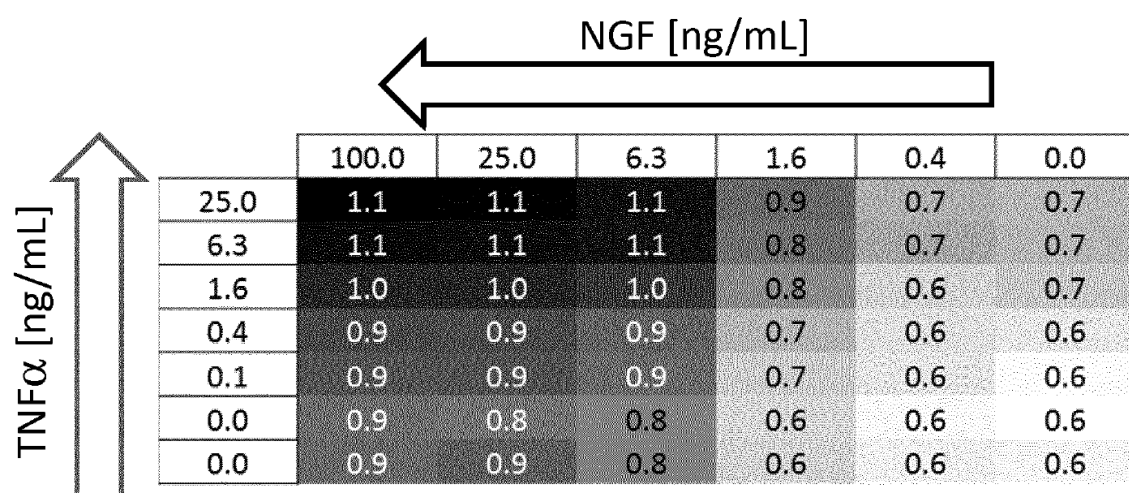
FIG. 14

FIG. 15

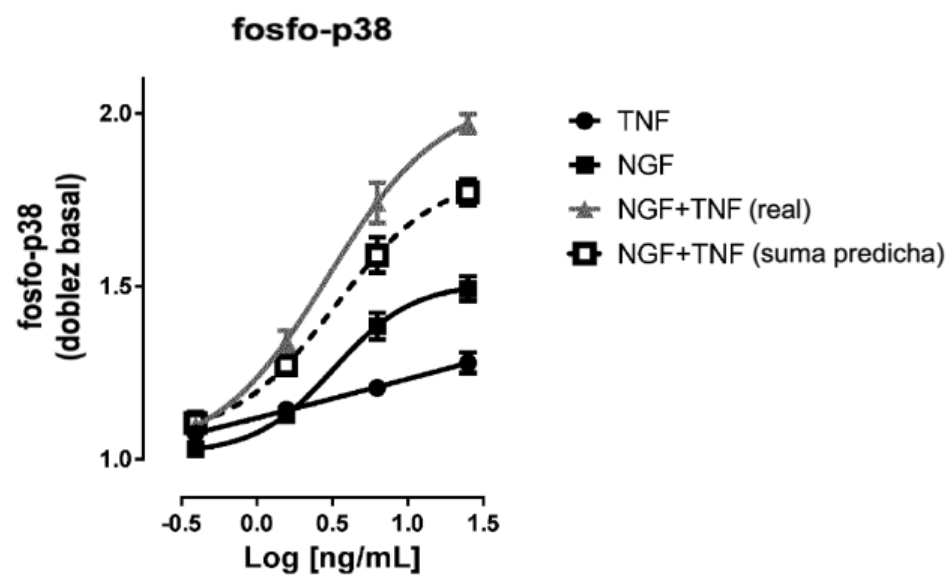


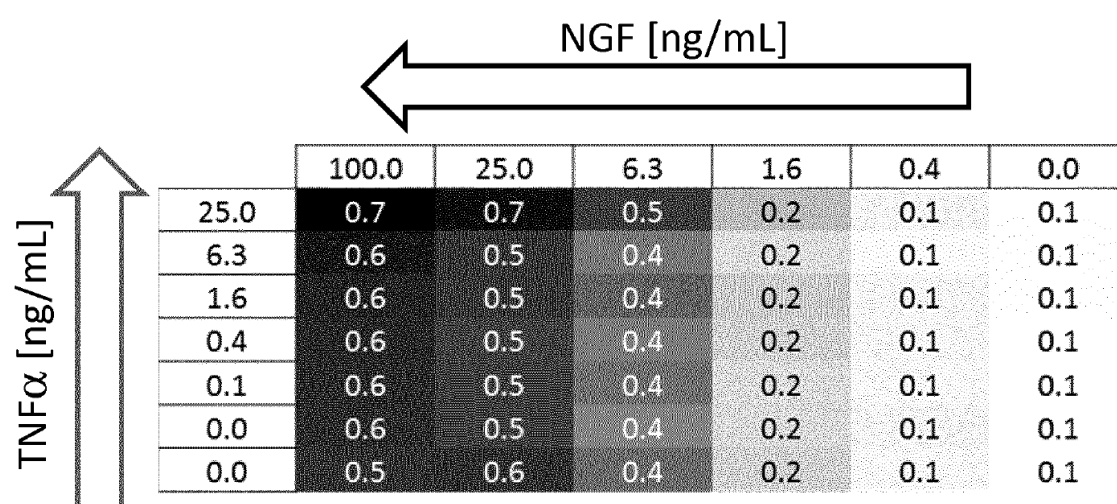
FIG. 16

FIG. 17

