

SIB EX4073R

V143147SM/AS

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n° 13711109.2, pubblicazione n° 2825208

a nome di Levicept Ltd.

di 3 Burlington Gardens London, Greater London W1S 3EP,

Regno Unito

“PROTEINA LEGANTE LA NEUROTROFINA P75NTR PER L’USO TERAPEUTICO”

Jacopo de Benedetti
USBM-043R B

DESCRIZIONE

Fondamento dell'invenzione

Le neurotrofine, il fattore di crescita neurotrofica (NGF), il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) e la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) agiscono attraverso quattro recettori: il recettore neurotrofico p75 a bassa affinità (p75NTR) e i recettori della tirosin chinasi a elevata affinità; TrkA, TrkB e TrkC. Il recettore a bassa affinità p75NTR si lega ed è attivato da tutte e quattro le neurotrofine ed è stato riportato che funziona indipendentemente dagli altri recettori. Tuttavia, i recettori Trk sono attivati in modo più selettivo, ovvero NGF è il ligando selettivo per TrkA, BDNF il ligando per TrkB e NT-3, 4/5 i ligandi per TrkC. Inoltre è stato riportato che, quando le proteine p75NTR e Trk sono coespresse, esse formano complessi, che modificano la segnalazione di entrambi i recettori (Huang and Reichardt, 2003). Infatti, è stato suggerito che p75NTR facilita la selettività di ciascuna delle neurotrofine per il loro rispettivo recettore Trk.

p75NTR è un membro della superfamiglia di recettori del fattore di necrosi tumorale (TNFR-SF) ed è stato il primo membro di questa superfamiglia a essere caratterizzato completamente. La superfamiglia (codificata da circa 30 geni negli esseri umani) è definita dai domini leganti il ligando costituiti da una o più (tipicamente quattro) ripetizioni di un dominio ricco di cisteina di 40 amminoacidi (CRD) che è stato identificato per la prima volta in p75NTR (Johnson *et al.*, 1986; Radeke *et al.*, 1987). Al contrario, nessun motivo di sequenza è condiviso dai domini intracellulari di tutti i membri della famiglia TNFR-SF. Di conseguenza, i meccanismi di segnalazione delle proteine TNFR-SF variano in modo significativo.

Una caratteristica non usuale della struttura di p75NTR è l'esistenza di un dimero di p75NTR legato mediante legami disolfuro, formati attraverso residui cisteinile nei domini transmembrana. Questo legame disolfuro è necessario per la segnalazione neurotrofina-dipendente efficace da parte di p75NTR e svolge un importante ruolo nella formazione di un dominio intracellulare ed extracellulare (Vilar *et al.*, 2009b). Esistono neurotrofine fisiologicamente come dimero associate in modo non covalente (Bothwell and Shooter, 1977) con un'emivita di distribuzione di circa 5 min (Tria *et al.*, 1994). L'attivazione di p75NTR neurotrofina-dipendente implica l'associazione di un dimero della neurotrofina con i CRD 2-4 dei due domini extracellulari di un dimero di

p75NTR (He and Garcia, 2004). Studi recenti supportano un modello in cui il legame della neurotrofina induce i due domini extracellulari dei dimeri di p75NTR a spostarsi più vicini, forzando i domini intracellulari ad allontanarsi in un moto snail-tong-simile centrato sul legame disolfuro e permettendo l'associazione dei domini intracellulari con le proteine adattatrici del segnale, NRIF e TRAF6 (Vilar *et al.*, 2009a, 2009b). I legami disolfuro del dominio intra-transmembrana, che sono presenti in p75NTR, non sono stati descritti precedentemente in altri membri della famiglia TNFR-SF, o in qualsiasi altra proteina di membrana.

p75NTR subisce il taglio proteolitico sequenziale da parte delle attività α -secretasica e γ -secretasica e metalloproteinasi di matrice (MMP), rilasciando il suo dominio intracellulare (ICD) nel citoplasma, in modo analogo alla via di segnalazione taglio-dipendente di Notch e alla proteina precursore β -amiloide (Jung *et al.*, 2003; Kanning *et al.*, 2003). Il rilascio citoplasmatico di ICD di p75NTR da parte di queste vie favorisce la segnalazione da parte di NRIF associata (Kenchappa *et al.*, 2006). Il ruolo del dominio extracellulare di p75NTR, dopo il taglio proteolitico da parte delle attività α -secretasica e γ -secretasica e MMP non è completamente compreso.

È stato documentato che NGF e altre neurotrofine (BDNF, NT-3 e NT-4/5) svolgono un ruolo significativo nella patologia ad esempio il dolore provocato da osteoartrite, pancreatite, artrite reumatoide, psoriasi, prurito e sclerosi multipla (Watanabe *et al.*, 2010; Raychaudhuri *et al.*, 2011; Barthel *et al.*, 2009; Truzzi *et al.*, 2011; McDonald *et al.*, 2011; Yamaoka *et al.*, 2007). È stato dimostrato che anticorpi selettivi contro qualsiasi delle neurotrofine; NGF o BDNF, NT-3 e NT-4/5, riducono significativamente il dolore. Inoltre, è stato dimostrato che anticorpi diretti contro i recettori delle neurotrofine p75NTR Trk A, Trk B o Trk C sono efficaci in modelli di dolore (Orita S *et al.*, 2010; Svensson P *et al.*, 2010; Iwakura *et al.*, 2010; Cirilio *et al.*, 2010; Pezet *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2011; Ueda *et al.*, 2010; Ghilardi *et al.*, 2010; Fukui *et al.*, 2010). Fukui *et al.*, (2010) in un modello di dolore (allodinia meccanica dopo compressione del nervo sciatico) hanno dimostrato efficacia su endpoint associati al dolore dopo il trattamento con un anticorpo anti-p75NTR. È stato concluso da questo studio che il trattamento con un anticorpo inibente p75NTR riduceva l'espressione di CGRP e p75NTR determinando una riduzione significativa del dolore.

La presente invenzione dimostra che il dominio extracellulare di p75NTR, esogeno o endogeno dopo taglio dalla membrana cellulare, agisce come proteina o recettore solubile legante la neurotrofina a ciascuna delle neurotrofine NGF, BDNF, NT-3 e NT-4/5 e svolge un ruolo importante nella funzione, fisiologia e omeostasi della funzione della neurotrofina. Inoltre, abbiamo descritto l'uso del dominio extracellulare di p75NTR per modulare o neutralizzare le azioni patologiche dei fattori neurotrofici inclusi NGF, BDNF, NT-3 e NT-4/5, ad esempio in modelli di allodinia statica e iperalgesia termica. Pertanto la proteina legante la neurotrofina p75NTR trova uso nel trattamento del dolore e altre patologie associate al fattore neurotrofico quali psoriasi, eczema, artrite reumatoide, cistite, endometriosi e osteoartrite.

Breve descrizione dell'invenzione

Secondo un primo aspetto della presente invenzione è fornita una proteina legante la neurotrofina p75NTR, (NBP), per l'uso nel trattamento del dolore come definito nelle rivendicazioni.

Secondo un secondo aspetto della presente invenzione è fornita una proteina legante la neurotrofina p75NTR per l'uso secondo il primo aspetto in cui, p75NTR(NBP) comprende p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie. Preferibilmente, p75NTR(NBP) è connessa a una o più molecole ausiliarie attraverso uno o più linker.

Secondo un terzo aspetto della descrizione è fornita una molecola di acido nucleico codificante p75NTR(NBP) o p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie della p75NTR(NBP), secondo il primo o il secondo aspetto la molecola di acido nucleico può ulteriormente comprendere codificante una sequenza segnale. È inoltre previsto l'uso della molecola di acido nucleico per il trattamento del dolore. Secondo un quarto aspetto della descrizione è fornito un vettore di espressione replicabile per transfettare una cellula, il vettore comprendente la molecola di acido nucleico del terzo aspetto, preferibilmente il vettore è un vettore virale. È previsto inoltre l'uso del vettore per il trattamento del dolore. Secondo un quinto aspetto della descrizione è fornita una cellula ospite che accoglie la molecola di acido nucleico del terzo o del quarto aspetto. Secondo un sesto aspetto della descrizione è fornita la p75NTR(NBP) per l'uso secondo il primo o il secondo aspetto o sue forme di realizzazione preferite, o l'acido nucleico o il vettore per l'uso secondo il terzo e quarto aspetto in cui p75NTR(NBP) o la molecola di acido nucleico o vettore è per l'uso separato, sequenziale o simultaneo in una

combinazione combinata con un secondo composto farmacologicamente attivo.

Descrizione delle figure

Figura 1. Sequenza del dominio extracellulare di p75NTR, domini leganti la neurotrofina evidenziati in grassetto.

Figura 2. Frammenti standard del peptide p75NBPP e co-immunoprecipitazione di p75NTR(NBP) e NGF che dimostra il complesso p75NTR(NBP)-NGF nel plasma umano.

Figura 3. Conferma di sequenza MS/MS del picco WADAECEEIPGR (SEQ ID NO. 7) in figura 2.

Figura 4. p75NTR(NBP) inibisce la funzione di NGF nella linea cellulare U20S che esprime TrkA e nella linea cellulare U20S che co-esprime TrkA e p75NTR.

Figura 5. p75NTR(NBP) solubile inibisce la funzione di BDNF nella linea cellulare U20S che esprime TrkA e nella linea cellulare U20S che co-esprime TrkA e p75NTR.

Figura 6. Dati Biocore che dimostrano il legame di p75NTR(NBP) a BDNF e la competizione tra anti-BDNF e p75NTR(NBP).

Figura 7. Inibizione da parte di p75NTR(NBP) dell'attività NGF nelle cellule PC12

Figura 8. Proteina legante la neurotrofina p75NTR(NBP) inibisce l'effetto del dolore da BDNF in un modello di eccitabilità nervosa

Figura 9. Proteina legante la neurotrofina p75NTR(NBP) inibisce l'iperalgia in un modello UVIH

Figura 10. SEQ ID NO. 1 sequenza amminoacidica completa di p75NTR umana

Figura 11. SEQ ID NO. 2 dominio extracellulare di p75NTR umana che include la sequenza segnale

Figura 12. SEQ ID NO. 3 dominio extracellulare di p75NTR umana senza sequenza segnale

Figura 13. SEQ ID NO. 4 dominio 1 legante la neurotrofina p75NTR(NBP) umana

Figura 14. SEQ ID NO. 5 dominio 2 legante la neurotrofina p75NTR(NBP) umana

Figura 15. SEQ ID NO. 6 dominio 3 legante la neurotrofina p75NTR(NBP) umana

Figura 16. SEQ ID NO. 7 dominio 4 legante la neurotrofina p75NTR(NBP) umana

Figura 17. SEQ ID NO. 8 dominio 5 legante la neurotrofina p75NTR(NBP) umana

Figura 18. SEQ ID NO. 9 transferrina umana

Figura 19. SEQ ID NO. 10 albumina umana

Figura 20. SEQ ID NO. 11 Fc IgG1 umana

Figura 21. SEQ ID NO. 12 Fc IgG2 umana

Figura 22. SEQ ID NO. 13 Fc IgG3 umana

Figura 23. SEQ ID NO. 14 Fc IgG4 umana

Figura 24. SEQ ID NO. 15 frammento Fc umano ingegnerizzato per l'emivita sierica prolungata

Figura 25. SEQ ID NO. 16 frammento Fc umano ingegnerizzato per la carenza delle funzioni effettrici

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

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

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

Descrizione dettagliata dell'invenzione

- Secondo un primo aspetto della presente invenzione come descritto è fornita una proteina legante la neurotrofina p75NTR (p75NTR(NBP)) per l'uso nel trattamento del dolore, o per la prevenzione e/o il trattamento del dolore e/o i sintomi di dolore o per migliorare, controllare, ridurre l'incidenza di, o ritardare lo sviluppo o la progressione del dolore e/o dei sintomi del dolore. Preferibilmente la proteina legante la neurotrofina p75NTR, p75NTR(NBP), è pegolata, preferibilmente inoltre è glicosilata.

La proteina legante la neurotrofina p75NTR, p75NTR(NBP), preferibilmente comprende (a) uno o più domini leganti la neurotrofina 1 [SEQ ID NO. 4], 2 [SEQ ID NO. 5], 3 [SEQ ID NO. 6], 4 [SEQ ID NO. 7] o 5 [SEQ ID NO. 8]. Inoltre preferibilmente p75NTR(NBP) comprende (b) ciascun dominio legante la neurotrofina 1 [SEQ ID NO. 4], 2 [SEQ ID NO. 5], 4 [SEQ ID NO. 7] e 5 [SEQ ID NO. 8] o (c) ciascun dominio 1 [SEQ ID NO. 4], 3 [SEQ ID NO. 6], 4 [SEQ ID NO. 7] e 5 [SEQ ID NO. 8]. Inoltre preferibilmente p75NTR(NBP) comprende il dominio 2 extracellulare [SEQ ID NO. 3] o una sua porzione comprendente (a), (b) o (c) di cui sopra. Inoltre preferibilmente p75NTR(NBP) comprende il dominio 1 extracellulare [SEQ ID NO. 2] o una sua porzione comprendente (a), (b) o (c) di cui sopra. Preferibilmente, p75NTR(NBP) si lega a ciascuna delle neurotrofine

NGF, NT3, BDNF e NT4/5, preferibilmente NGF, NT3, BDNF e NT4/5 umane. Inoltre preferibilmente p75NTR(NBP) si lega a ciascuna delle neurotrofine NGF, NT3, BDNF e NT4/5, preferibilmente NGF, NT3, BDNF e NT4/5 umane, preferibilmente con una costante di legame equivalente a o uguale alla sequenza completa nativa di p75NTR [SEQ ID NO. 1]. Le costanti di legame possono essere determinate usando i saggi descritti nella presente ad esempio mediante l'uso di risonanza plasmonica di superficie a 20°C, saggi per le costanti di legame della proteina nativa sono note e comprendono saggi a base di cellule note nella tecnica. Preferibilmente p75NTR(NBP) protegge una o più delle neurotrofine precedentemente citate dalla degradazione nel plasma o in altri fluidi corporei, *in-vitro* o *in-vivo* e/o mantiene l'equilibrio omeostatico di una o più delle neurotrofine precedentemente citate rispetto alla loro forma biologicamente libera.

p75NTR(NBP) della presente invenzione si lega preferibilmente a uno qualsiasi o più tra NGF, , BDNF, NT3 o NT4/5 con un'affinità di legame (K_d) tra circa 0,1 nM e circa 50 nM. In alcune forme di realizzazione preferite, l'affinità di legame (K_d) è tra circa 0,1 nM e qualsiasi tra circa 0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM, 1,5 nM, 2 nM, 2,5 nM, 3 nM, 3,5 nM, 4 nM, 4,5 nM, 5 nM, 5,5 nM, 6 nM, 6,5 nM, 7 nM, 7,5 nM, 8 nM, 8,5 nM, 9 nM, 9,5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 35 nM, 40 nM, 45 nM o 50 nM come misurato in un saggio di legame in vitro per NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 come descritto nella presente preferibilmente come misurato mediante risonanza plasmonica di superficie a 20°C. In alcune forme di realizzazione ulteriormente preferite, l'affinità di legame (K_d) è, o è inferiore a, qualsiasi tra 250 pM, 300 pM, 350 pM, 400 pM, 450 pM, 500 pM, 550 pM, 600 pM, 650 pM, 700 pM, 750 pM, 800 pM, 850 pM, 950 pM o 1 nM come misurato in un saggio di legame in vitro per p75NTR(NBP) con le neurotrofine come descritto nella presente, preferibilmente come misurato mediante risonanza plasmonica di superficie a 20°C. In un'ulteriore forma di realizzazione più preferita l'affinità di legame (K_d) è da circa 0,3 nM o circa 1 nM, come misurato in un saggio di legame in vitro per p75NTR(NBP) con le neurotrofine come descritto nella presente, preferibilmente come misurato mediante risonanza plasmonica di superficie a 20°C.

Inoltre preferibilmente p75NTR(NBP) interessa l'attività funzionale delle neurotrofine sopra citate, (definite come modulanti o regolanti positivamente o negativamente l'attività funzionale delle neurotrofine) NGF, BDNF,

NT3 o NT4/5, ad esempio l'attività funzionale delle neurotrofine sopra citate derivate dalla loro interazione con i loro rispettivi recettori.

Preferibilmente p75NTR(NBP) interessa l'attività funzionale di BDNF come valutato mediante saggio funzionale di qualsiasi tra crescita e differenziazione di neuroni e sinapsi, sopravvivenza e differenziazione in coltura cellulare neuronale, segnalazione Trk, stimolazione della crescita degli assoni *in vitro* o *in vivo*.

Preferibilmente p75NTR(NBP) interessa l'attività funzionale di NGF come valutato misurando il legame di NGF a, e l'attivazione di, TrkA, come dimostrato in saggi di sopravvivenza dei neuroni classici (come fornito in Cowan, W.M., Hamburger, V., Levi-Montalcini, R. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001;24:551-600).

Preferibilmente p75NTR(NBP) interessa l'attività funzionale di NT3 come valutato misurando il legame di NT3 a, e l'attivazione della attività del recettore Trk endogeno, come dimostrato nella fosforilazione del recettore Trk, saggi reporter di fosforilazione della protein chinasi mitogeno-attivata o sopravvivenza cellulare e saggi di estensione dei neuriti.

Preferibilmente p75NTR(NBP) interessa l'attività funzionale di NT4/5 come valutato misurando saggi di fosforilazione e attivazione di NT4/5 *in vitro* o *in vivo* ad esempio in saggi di fosforilazione della proteina basica della mielina (MBP) o in alternativa *in vivo* in un saggio di angiogenesi Matrigel di angiogenesi indotta dal fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF)/fattore di crescita dei fibroblasti basici.

Preferibilmente p75NTR(NBP) si lega ai residui di contatto di una o più delle neurotrofine NGF, NT3, BDNF e NT4/5 come mostrato in He and Garcia (2001) *Science*, 301, pagine 870 - 805.

Preferibilmente p75NTR(NBP) è solubile, preferibilmente solubile in soluzione acquosa, preferibilmente solubile in un fluido biologico quale siero, plasma, sangue.

- Secondo un secondo aspetto della presente invenzione è fornita una p75NTR(NBP) per l'uso secondo il primo aspetto in cui p75NTR(NBP) comprende p75NTR(NBP), preferibilmente p75NTR(NBP) del primo aspetto, connessa a una o più molecole ausiliarie. Preferibilmente, p75NTR(NBP) è connessa a una o più molecole ausiliarie attraverso uno o più linker.

Preferibilmente una o più molecole ausiliarie sono selezionate tra: (a) transferrina o una sua porzione,

preferibilmente la transferrina è transferrina umana, preferibilmente SEQ ID NO. 9, (b) albumina o una sua porzione, preferibilmente l'albumina è albumina umana, preferibilmente SEQ ID NO. 10 (c) un Fc immunoglobulinico o una sua porzione, preferibilmente Fc immunoglobulinico è Fc immunoglobulinico umano, (d) una catena polimerica di glicole polietilenico (e) una catena carboidrato.

Come usata nella presente, l'espressione "Fc immunoglobulinico" o "Ig Fc" è intesa indicare la porzione carbossi-terminale di una regione costante della catena immunoglobulinica, preferibilmente una regione costante della catena pesante immunoglobulinica, o una sua porzione. Preferibilmente Fc immunoglobulinico comprende 1) un dominio CH1, un dominio CH2 e un dominio CH3, opzionalmente con una regione cerniera immunoglobulinica, 2) un dominio CH1 e un dominio CH2, opzionalmente con una regione cerniera immunoglobulinica, 3) un dominio CH1 e un dominio CH3, opzionalmente con una regione cerniera immunoglobulinica, 4) un dominio CH2 e un dominio CH3, opzionalmente con una regione cerniera immunoglobulinica o 5) una combinazione di due o più domini selezionati tra CH1, CH2 e CH3 opzionalmente combinati con una regione cerniera immunoglobulinica. Preferibilmente Fc immunoglobulinico comprende almeno una regione cerniera immunoglobulinica, un dominio CH2 e un dominio CH3, e opzionalmente un dominio CH1. Preferibilmente Fc immunoglobulinico comprende o è costituito da un Fc o da una porzione di un Fc di una immunoglobulina di isotipo selezionato tra IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, in modo ulteriormente preferibile, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, sIgA, in modo maggiormente preferibile IgG2 o IgG4, in modo massimamente preferibile IgG2. Opzionalmente Fc immunoglobulinico comprende inoltre mutazioni, delezioni, sostituzioni amminoacidiche o modificazioni chimiche che servono per minimizzare la fissazione del complemento o la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente o che migliorano l'affinità di legame al recettore Fc.

In modo ulteriormente preferibile Fc immunoglobulinico comprende o è costituito da qualsiasi tra: (a) un dominio CH2 o una sua porzione e un dominio CH3 o una sua porzione, (b) un dominio CH2 o una sua porzione, o (c) un dominio CH3 o una sua porzione, in cui Fc immunoglobulinico o sua porzione è di isotipo selezionato tra IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, in modo ulteriormente preferibile, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, sIgA, in modo maggiormente preferibile IgG2 o IgG4, in modo massimamente preferibile IgG2.

Preferibilmente Fc immunoglobulinico comprende o è costituito da una regione carbossi-terminale di una catena pesante immunoglobulinica e può comprendere i domini CH2 e/o CH3, o loro parti, dagli isotipi anticorpali IgG, IgA o IgD, o i domini CH2 e/o CH3 e/o CH4, o loro parti di IgM o IgE. Preferibilmente Fc immunoglobulinico comprende o è costituito da un frammento di Fc, comprendente principalmente CH3 e una piccola porzione di CH2, come è derivabile mediante digestione con pepsina dell'immunoglobulina. Preferibilmente Fc immunoglobulinico comprende o è costituito da una regione Fc completa, comprendente CH2 e CH3, connesse inoltre alla regione cerniera che è un corto segmento della catena pesante che connette le regioni CH1 e CH2 nell'immunoglobulina intatta, come può essere prodotto mediante digestione con papaina dell'immunoglobulina. Preferibilmente la regione cerniera immunoglobulinica comprende o è costituita da una regione cerniera o parte di una regione cerniera derivata da una IgG, preferibilmente IgG umana, in modo maggiormente preferibile selezionata tra IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4, in modo massimamente preferibile IgG1, o in alternativa è una variante di specie o allelica delle forme di realizzazione della regione cerniera precedente. La regione cerniera o una parte di una regione cerniera immunoglobulinica può essere presente all'estremità C o N-terminale della regione Fc, preferibilmente all'estremità N-terminale.

Secondo una forma di realizzazione preferita della presente invenzione l'Fc immunoglobulinico preferibilmente comprende o è costituito da un Fc o una porzione di un Fc di un'immunoglobulina che comprende una o più mutazioni amminoacidiche della sequenza di tipo selvatico nella regione CH2 che riduce la funzione effettrice di Fc. Preferibilmente queste mutazioni sono da A330, P331 in S330, S331 (numerazione amminoacidica con riferimento alla sequenza di IgG2 di tipo selvatico, in cui la regione CH2 è nella regione costante della catena pesante di IgG2 umana: [Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624]. Preferibilmente Fc immunoglobulinico è glicosilato e altamente carico a pH fisiologico quindi aiuta a solubilizzare p75NTR(NBP). La regione Fc consente inoltre la rivelazione di p75NTR(NBP) mediante ELISA anti-Fc ad esempio a scopi diagnostici. p75NTR(NBP) dell'invenzione è preferibilmente sintetizzata in una cellula che glicosila l'Fc della Ig preferibilmente in siti di glicosilazione normale.

Preferibilmente l'Fc immunoglobulinico comprende o è costituito da una regione Fc immunoglobulinica umana

della sequenza amminoacidica selezionata tra SEQ ID No. 11, 12, 13, 14, 15 o 16 o una loro variante di specie o allelica, o i domini CH2 e/o CH3, o loro porzioni derivate da SEQ ID No. 11, 12, 13, 14, 15 o 16.

Secondo la presente invenzione, p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie preferibilmente dimostra proprietà biologiche vantaggiose di solubilità migliorata di p75NTR(NBP) e/o stabilità di p75NTR(NBP) e/o emivita sierica migliorata di p75NTR(NBP). La solubilità migliorata è desiderabile affinché la biodisponibilità di p75NTR(NBP) sia massimizzata alla somministrazione e possa essere determinato e ottenuto il dosaggio preciso di p75NTR(NBP). La solubilità migliorata è vantaggiosa per superare il problema di aggregati che causano dolore indesiderabile nel rilascio *in-vivo* e portano a possibile infiammazione. L'emivita sierica migliorata ha il vantaggio di facilitare livelli ridotti o frequenza ridotta di richiesta di dose durante l'uso per il trattamento al fine di ottenere l'effetto terapeutico equivalente o mantenuto di p75NTR(NBP) rilasciata. Un'emivita prolungata e una maggiore stabilità nel sangue o siero ha il vantaggio di consentire un regime di dosaggio di somministrazione meno frequente e/o livelli di dosaggio inferiori quindi ridurre la possibile tossicità o gli effetti collaterali *in-vivo*. In questo caso p75NTR(NBP) è più potente nel suo effetto terapeutico e/o più stabile nella circolazione. Le dosi inferiori o meno frequenti risultanti sono vantaggiose per minimizzare qualsiasi possibile effetto tossico o effetto collaterale potenzialmente associato alla somministrazione di p75NTR(NBP). Il peso molecolare di p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie è anche aumentato rispetto a p75NTR(NBP) da sola, ciò ha il vantaggio che la molecola sarà ben ritenuta nella circolazione sanguigna quando somministrata per via endovenosa riducendo il rischio di penetrazione in siti indesiderati, ad esempio, nel sistema nervoso centrale, e rendendo la molecola adatta per la ritenzione o la concentrazione nei tessuti mirati.

Preferibilmente p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie dimostra solubilità migliorata di p75NTR(NBP) e/o stabilità migliorata di p75NTR(NBP) e/o emivita sierica migliorata rispetto a p75NTR(NBP) non così connessa. Preferibilmente la solubilità migliorata è la solubilità in una soluzione acquosa quale acqua preferibilmente con eccipienti quali tamponi e/o sali preferibilmente a un pH fisiologico, preferibilmente tra pH 5 e pH 8, preferibilmente a circa pH 7, o è la solubilità in un fluido biologico quale siero o sangue.

Preferibilmente la stabilità migliorata è la stabilità dell'attività o dell'integrità strutturale della proteina p75NTR(NBP) dovuta agli effetti di denaturazione, ossidazione, frammentazione o aggregazione in un periodo di tempo, durante un periodo di conservazione o dopo congelamento e scongelamento. La stabilità strutturale può essere giudicata mediante misure standard di denaturazione, ossidazione, aggregazione o aggregazione, la stabilità dell'attività può essere misurata mediante saggi di legame o funzionali descritti nella presente, sono noti metodi di misurazione dell'emivita sierica della proteina.

Preferibilmente p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie può essere espressa a elevati livelli da numerose cellule ospite di mammifero per fornire una singola specie e può essere efficacemente purificata mediante cromatografia di affinità ad esempio mediante legame alla proteina A di *Staphylococcus aureus*. Preferibilmente p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie può dimerizzare e preferibilmente il dimero ha affinità aumentata per le neurotrofine NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 rispetto a p75NTR(NBP) non così connessa. Il legame più stretto ha il vantaggio di una potenza più elevata e di un'efficacia terapeutica più elevata come giudicato dagli effetti di p75NTR(NBP) ad esempio come determinato mediante saggi funzionali della neurotrofina descritti nella presente. La potenza più elevata ha il beneficio che p75NTR(NBP) può essere usata a quantità di dosaggio inferiori per ottenere la stessa efficacia terapeutica riducendo quindi la possibile tossicità o gli effetti collaterali *in-vivo*.

Preferibilmente p75NTR(NBP) dell'invenzione ha un'emivita *in-vivo* di circa, o superiore a, uno qualsiasi tra 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 62, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208 o 210 ore +/- 1 ora, in modo ulteriormente preferibile p75NTR(NBP) dell'invenzione ha un'emivita *in-vivo* di circa, o superiore a, 24 ore.

In modo ulteriormente preferibile p75NTR(NBP) dell'invenzione ha un'emivita *in-vitro* di circa, o superiore a, uno qualsiasi tra 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54,

56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 62, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208 o 210 giorni +/- 1 giorno, in modo ulteriormente preferibile p75NTR(NBP) dell'invenzione ha un'emivita in-vitro di circa, o superiore a, 6 giorni. Preferibilmente la stabilità è misurata circa a pH fisiologico, in una soluzione acquosa tamponata, preferibilmente a 20°C o 37°C.

Secondo le precedenti forme di realizzazione preferite, preferibilmente l'emivita in-vivo è l'emivita in un ratto o l'emivita in un essere umano, in modo maggiormente preferibile in un essere umano. Preferibilmente l'emivita è determinata da misurazioni sieriche dei livelli di p75NTR(NBP) dell'invenzione dopo somministrazione in-vivo ad esempio mediante iniezione endovenosa o sottocutanea.

- Inoltre secondo il secondo aspetto dell'invenzione il linker è preferibilmente selezionato tra: (a) un legame covalente, (b) un legame non covalente, (c) un legame peptidico, (d) un amminoacido o una pluralità di amminoacidi comprendenti un peptide. Preferibilmente p75NTR(NBP) è connessa a più di una molecola ausiliaria, opzionalmente ciascuna molecola ausiliaria è la stessa o differente o una miscela della stessa e della differente. In modo ulteriormente preferibile più di una molecola ausiliaria comprende un multimerico o una pluralità di molecole ausiliarie legate a p75NTR(NBP) attraverso un linker, e in cui ciascuna molecola può essere uguale o differente o una miscela della stessa e della differente.

Preferibilmente il linker comprende o è costituito da uno o da una pluralità di amminoacidi o comprende o è costituito da una sequenza polipeptidica di amminoacidi, preferibilmente da circa 1 a circa 25 amminoacidi, preferibilmente uno qualsiasi tra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 amminoacidi in modo ulteriormente preferibile uno qualsiasi tra circa 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 amminoacidi, in modo massimamente preferibile 13 amminoacidi.

Preferibilmente il linker comprende o è costituito da una sequenza polipeptidica di amminoacidi che è priva di qualsiasi struttura secondaria stabile quale un'alfa elica, filamento beta, elica 3_{10} ed elica pi, elica di poliprolina, foglietto alfa. Preferibilmente la regione linker comprende o è costituita da una sequenza polipeptidica di

amminoacidi che definisce un polipeptide flessibile o dinamico o non strutturato quale ad esempio un'ansa flessibile, una spirale casuale o un giro flessibile, tali polipeptidi non strutturati sono spesso riscontrati in connessione a regioni di struttura secondaria in grosse molecole proteiche.

Preferibilmente il linker è una sequenza polipeptidica di amminoacidi che comprende oltre o circa 50% di glicina e/o alanina e/o serina in p75NTR(NBP), in modo ulteriormente preferibile oltre o circa il 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% di glicina e/o alanina e/o serina in p75NTR(NBP). Preferibilmente la regione linker comprende o è costituita da una sequenza polipeptidica di amminoacidi che comprende sia glicina sia serina, preferibilmente con una percentuale superiore di glicina rispetto alla serina, preferibilmente la regione linker comprende o è costituita da linker flessibili, SEQ ID NO. 17 (GGGGS) n ($n =$ da 1 a 4), o linker elicali, SEQ ID NO. 18 (EAAAK) n ($n =$ da 2 a 5) o linker polipeptidici che includono principalmente residui amminoacidici selezionati tra glicina, serina, alanina e treonina che variano da 1 a 10 ripetizioni di ciascun amminoacido e qualsiasi loro combinazione.

Preferibilmente il linker supera o evita l'impedimento sterico della molecola ausiliaria che potrebbe interferire con la capacità di legame della neurotrofina sopra citata o l'attività biologica di p75NTR(NBP) rispetto a p75NTR(NBP) che non è legata a una molecola ausiliaria. Quindi la regione linker preferibilmente consente la flessibilità tra p75NTR(NBP) e la molecola ausiliaria e consente la ritenzione di o il miglioramento dell'attività biologica sopra citata di p75NTR(NBP) rispetto a p75NTR(NBP) libera o nativa non così legata come determinato mediante legame alle neurotrofine usando saggi di legame come descritto nella presente.

In modo ulteriormente preferibile il linker è immunologicamente inerte, in modo che non inneschi lisi mediata dal complemento, non stimoli la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC), non attivi la microglia o le cellule T. Preferibilmente la regione linker ha una o più di queste attività ridotte.

In modo ulteriormente preferibile il linker comprende o è costituito da un polipeptide noto o previsto dall'analisi strutturale o previsione strutturale come polipeptide flessibile o dinamico o non strutturato o privo di struttura secondaria stabile.

In modo massimamente preferibile il linker comprende o è costituito da un polipeptide di sequenza di SEQ ID

NO. 19 (GGGGS).

p75NTR(NBP) dell'invenzione può anche comprendere un sito di taglio proteolitico, opzionalmente interposto tra p75NTR(NBP) e la molecola ausiliaria. Il sito di taglio proteolitico può essere situato nel linker o nella giunzione del linker con p75NTR(NBP) o/e la molecola ausiliaria. p75NTR(NBP) può opzionalmente essere tagliata dalla molecola ausiliaria prima della formulazione e o della somministrazione per gli scopi terapeutici.

Preferibilmente il linker e/o una o più molecole ausiliarie non deteriora o deteriora in modo significativo p75NTR(NBP):

(a) effetto sull'attività funzionale delle neurotrofine (definite come modulanti o che regolano positivamente o negativamente l'attività funzionale delle neurotrofine) NGF, BDNF, NT3 o NT4/5,

(b) affinità di legame per qualsiasi tra NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 con un'affinità di legame tra circa 0,1 nM e circa 50 nM

(c) capacità di legarsi a ciascuna delle neurotrofine NGF, NT3, BDNF e NT4/5, preferibilmente NGF, NT3, BDNF e NT4/5 umane.

Secondo una forma di realizzazione preferita degli aspetti uno e due della presente invenzione è fornita una p75NTR(NBP) della presente invenzione in cui è fornita una p75NTR(NBP) per l'uso nel trattamento del dolore in cui p75NTR(NBP) è costituita da: (A) p75NTR(NBP) di sequenza SEQ ID NO. 3, e opzionalmente (B) un Fc immunoglobulinico, e inoltre opzionalmente costituito dalla sequenza SEQ ID NO. 11 e opzionalmente (C) un linker, opzionalmente costituito da SEQ ID NO. 19.

- Secondo un terzo aspetto della descrizione è fornita una molecola di acido nucleico codificante p75NTR(NBP) o p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie secondo il primo o il secondo aspetto. Preferibilmente la molecola di acido nucleico è per l'uso nel trattamento del dolore.

Secondo una forma di realizzazione preferita della presente descrizione la molecola di acido nucleico può comprendere inoltre una regione codificante una sequenza segnale, preferibilmente una sequenza segnale di p75NTR ad esempio una sequenza di DNA o RNA.

- Secondo un quarto aspetto della descrizione è fornito un vettore di espressione replicabile per transfettare una

cellulare, il vettore comprendente la molecola di acido nucleico del terzo aspetto, preferibilmente il vettore è un vettore virale. Preferibilmente il vettore è per l'uso nel trattamento del dolore.

- *Inoltre secondo il terzo o quarto aspetto dell'invenzione* è fornito un metodo per l'espressione della molecola di acido nucleico o del vettore dell'invenzione per produrre o secernere p75NTR(NBP) o p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie. Preferibilmente il metodo comprende l'introduzione della molecola di acido nucleico o vettore in una cellula e l'espressione dell'acido nucleico in essa per produrre o secernere p75NTR(NBP) o p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie. Preferibilmente la molecola di acido nucleico o il vettore sono introdotti nella cellula *in-vitro*, in alternativa *in-vivo*. Preferibilmente p75NTR(NBP) espressa o p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie è espressa *in-vitro*, opzionalmente inoltre isolata e purificata, in alternativa preferibilmente p75NTR(NBP) espressa o p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie è espressa *in-vivo*, preferibilmente l'espressione *in-vivo* costituisce la terapia genica. Preferibilmente il vettore è un vettore di espressione replicabile, opzionalmente per transfettare una cellula di mammifero, preferibilmente il vettore è un vettore virale.

- *Secondo un quinto aspetto della descrizione è fornita* una cellula ospite che accoglie la molecola di acido nucleico o il vettore del terzo o quarto aspetto, preferibilmente la cellula è una cellula di mammifero.

- *Secondo un sesto aspetto della descrizione è fornita* una p75NTR(NBP) per l'uso secondo il primo o secondo aspetto o le loro forme di realizzazione preferite, o l'acido nucleico o il vettore per l'uso secondo un terzo e quarto aspetto, in cui il dolore o sintomo del dolore è selezionato tra:

- (a) dolore acuto e/o dolore spontaneo,
- (b) dolore cronico e/o dolore continuo,
- (c) dolore infiammatorio che include uno qualsiasi tra dolore artritico, dolore derivante da osteoartrite o artrite reumatoide, derivante da malattie infiammatorie dell'intestino, psoriasi ed eczema
- (d) dolore nocicettivo,
- (e) dolore neuropatico, che include neuropatia diabetica dolorosa o dolore associato nevralgia post-erpetica,
- (f) iperalgesia,

(g) allodinia,

(h) dolore centrale, dolore centrale post-ictus, dolore derivante da sclerosi multipla, dolore derivante da lesione del midollo spinale, dolore derivante da morbo di Parkinson o epilessia,

(i) dolore da cancro,

(j) dolore post-operatorio,

(k) dolore viscerale, che include dolore viscerale del tratto digestivo, e dolore viscerale non del tratto digestivo, dolore dovuto a disturbi gastrointestinali (GI), dolore derivante da disturbi funzionali dell'intestino (FBD), dolore derivante da malattie infiammatorie dell'intestino (IBD), dolore derivante da dismenorrea, dolore pelvico, cistite, cistite interstiziale o pancreatite,

(l) dolore muscolo-scheletrico, mialgia, fibromialgia, spondilite, artropatie sieronegative (non reumatoidi), reumatismo non articolare, distrofinopatia, glicogenolisi, polimiosite, piomiosite,

(m) dolore cardiaco o vascolare, dolore dovuto ad angina, infarto miocardico, stenosi mitrale, pericardite, fenomeno di Raynaud, sclerodermia, sclerodermia o ischemia muscolare scheletrica,

(n) dolore alla testa inclusa emicrania, emicrania con aura, emicrania senza aura, cefalea a grappolo, cefalea di tipo tensivo,

(o) dolore orofacciale, che include dolore dentale, dolore miofasciale temporomandibolare o tinnito, o

(p) dolore lombare, borsite, dolore mestruale, emicrania, dolore riferito, nevralgia del trigemino, ipersensibilizzazione, dolore derivante da trauma spinale e/o degenerazione o ictus.

- Secondo un settimo aspetto della descrizione è fornita p75NTR(NBP) per l'uso secondo il primo o secondo aspetto o le sue forme di realizzazione preferite, o la molecola di acido nucleico o il vettore per l'uso secondo il terzo o quarto aspetto in cui p75NTR(NBP) o la molecola di acido nucleico o il vettore sono per l'uso separato, sequenziale o simultaneo in una combinazione combinata con un secondo composto farmacologicamente attivo.

Preferibilmente il secondo composto farmacologicamente attivo della combinazione è selezionato tra:

- un analgesico oppioide, ad es morfina, eroina, idromorfone, ossimorfone, levorfanolo, levallorfanolo, metadone, meperidina, fentanil, cocaina, codeina, diidrocodone, ossicodone, idrocodone, propofisene, nalmeffene,

nalorfina, naloxone, naltrexone, buprenorfina, butorfanolo, nalbufina o pentazocina;

- un farmaco antinfiammatorio non steroideo (FANS), ad es, aspirina, diclofenac, diflusal, etodolac, fenbufene, fenoprofene, flufenisal, flurbiprofene, ibuprofene, indometacina, chetoprofene, chetorolac, acido meclofenammico, acido mefenammico, meloxicam, nabumetone, naprossene, nimesulide, nitroflurbiprofene, olsalazina, ossaprozina, fenilbutazone, piroxicam, solfasalazina, sulindac, tolmetina o zomepirac;

- un sedativo barbiturato, ad es, amobarbital, aprobarbital, butabarbital, butabital, mefobarbital, metarbital, metoesital, pentobarbital, fenobarbital, secobarbital, talbutal, teamilal o tiopental;

- una benzodiazepina avente un'azione sedativa, ad e, clordiazepossido, clorazepato, diazepam, flurazepam, lorazepam, ossazepam, temazepam o triazolam;

- un antagonista del recettore H₁ avente un'azione sedativa, ad es difenidramina, pirlamina, prometazina, clorfeniramina o clorciclizina;

- un sedativo quale glutetimide, meprobamato, metaqualone o dicloralfenazone;

- un miorilassante scheletrico, ad es, baclofene, carisoprodolo, clorzossazone, ciclobenzaprina, metocarbamolo o orfrenadina;

- ● un antagonista del recettore NMDA, ad es, destrometorfàn ((+)-3-idrossi-N-metilmorfinano) o suo metabolita destrorfàn ((+)-3-idrossi-N-metilmorfinano), chetamina, memantina, pirrolochinolin chinina, acido cis-4-(fosfometil)-2-piperidincarbossilico, budipina, EN-3231 (MorphiDex®, una formulazione combinata di morfina e destrometorfano), topiramato, neramexane o perzinfotel incluso un antagonista di NR2B, ad es ifenprodil, traxoprodil o (-)-(R)-6-{2-[4-(3-fluorofenil)-4-idrossi-1-piperidinil]-1-idrissietil-3,4-diidro-2(1H)-chinolinone};

- un alfa-adrenergico, ad es doxazosina, tamsulosina, clonidina, guanfacina, dexmetatomidina, modafinil, o 4-ammino-6,7-dimetossi-2-(5-metan-solfonammido-1,2,3,4-tetraoidroisochinol-2-il)-5-(2-piridil)chinazolina;

- un antidepressivo triciclico, ad es, desipramina, imipramina, amitriptilina o nortriptolina;

- un anticonvulsivo, ad es, carbamazepina, lamotrigina, topiramato o valproato;

- un antagonista della tachichinina (NK), in particolare un antagonista NK-3, NK-2 o NK-1, ad es, (α R,9R)-7-

[3,5-bis(trifluorometil)benzil]-8,9,10,1-1-tetraidro-9-metil-5-(4-metilfenil)-7H-[1,4]diazocino[2,1-g][1,7]-naftiridin-6-13-dione (TAK-637), 5-[[2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etossi-3-(4-fluorofenil)-4-morfolinil]-metil]-1,2-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-one (MK-869), aprepitant, lanepitant, dapitant o 3-[[2-metossi-5-(trifluorometossi)fenil]-metilammino]-2-fenilpiperidina (2S,3S);

- un antagonista muscarinico, ad es, ossibutinina, tolterodina, propiverina, tropsio cloruro, darifenacina, solifenacina, temiverina e ipratropio;
- un inibitore selettivo di COX-2, ad es, celecoxib, rofecoxib, parecoxib, valdecoxib, deracoxib, etoricoxib, o lumiracoxib;
- un analgesico a base di catrame di carbone, in particolare paracetamolo;
- un neurolettico quale droperidolo, clorpromazina, aloperidolo, perfenazina, tioridazina, mesoridazina, trifluoperazina, flufenazina, clozapina, olanzapina, risperidone, ziprasidone, quetiapina, sertindolo, aripiprazolo, sonepiprazolo, blonanserina, iloperidone, perospirone, raclopride, zotepina, bifeprunox, asenapina, lurasidone, amisulpride, balaperidone, palindore, eplivanserina, osanetant, rimonabant, meclinertant, Miraxion® o sarizotan;
- un agonista (ad es resiniferatossina) o antagonista (ad es, capsazepina) del recettore vanilloide;
- un beta-adrenergico quale propranololo;
- un anestetico locale quale mexiletina;
- un corticosteroide quale desametasone;
- un agonista o antagonista del recettore 5-HT, in particolare un agonista di 5-HT_{1B/1D} quale eletriptan, sumatriptan, naratriptan, zolmitriptan o rizatriptan;
- un antagonista del recettore 5-HT_{2A} quale R(+)-alfa-(2,3-dimetossi-fenil)-1-[2-(4-fluorofeniletil)]-4-piperidinemetanolo (MDL-100907);
- un analgesico colinergico (nicotinico), quale ispronclina (TC-1734), (E)-N-metil-4-(3-piridinil)-3-buten-1-ammina (RJR-2403), (R)-5-(2-azetidilmotossi)-2-cloropiridina (ABT-594) o nicotina;
- Tramadol®;
- un inibitore di PDEV, quale 5-[2-etossi-5-(4-metil-1-piperazinil-solfonil)fenil]-1-metil-3-n-propil-1,6-diidro-

7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-one (sildenafil), (6R,12aR)-2,3,6,7,12,12a-esaidro-2-metil-6-(3,4-metilendioossifenil)-pirazino[2',1':6,1]-pirido[3,4-b]indol-1,4-dione (IC-351 o tadalafil), 2-[2-etossi-5-(4-etilpiperazin-1-il-1-solfonil)-fenil]-5-metil-7-propil-3H-imidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4-one (vardenafil), 5-(5-acetil-2-butossi-3-piridinil)-3-etil-2-(1-etil-3-azetidil)-2,6-diidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-one, 5-(5-acetil-2-propossi-3-piridinil)-3-etil-2-(1-isopropil-3-azetidil)-2,6-diidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-one, 5-[2-etossi-5-(4-etilpiperazin-1-ilsolfonil)piridin-3-il]-3-etil-2-[2-metossietil]-2,6-diidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-one, 4-[(3-cloro-4-metossibenzil)ammino]-2-[(2S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-il]-N-(pirimidin-2-ilmetil)pirimidin-5-carbossammide, 3-(1-metil-7-osso-3-propil-6,7-diidro-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)-N-[2-(1-metilpirrolidin-2-il)etil]-4-propossibenzensolfonammide;

- un cannabinoide;
- antagonista del recettore metabotropico del glutammato sottotipo 1 (mGluR1);
- un inibitore della ricaptazione della serotonina quale sertralina, metabolita della sertralina demetilsertralina, fluoxetina, norfluoxetina (metabolita fluoxetina desmetile), fluvoxamina, paroxetina, citalopram, metabolita di citalopram desmetilcitalopram, escitalopram, d,l-fenfluramina, femoxetina, ifoxetina, cianodotiepinga, litoxetina, dapoxetina, nefazodone, cericlamina e trazodone;
- un inibitore della ricaptazione della noradrenalina (norepinefrina), quale maprotilina, lofepramina, mirtazepina, oxaprotilina, fezolamina, tomoxetina, mianserina, bupropione, metabolita del bupropione idrossibupropione, nomifensina e viloxazina (Vivalan®), in particolare un inibitore selettivo della ricaptazione della noradrenalina quale reboxetina, in particolare (S,S)-reboxetina;
- inibitore doppio della ricaptazione della serotonina-noradrenalina, quale venlafaxina, metabolita della venlafaxina O-desmetilvenlafaxina, clomipramina, metabolita della clomipramina desmetilclomipramina, duloxetina, milnacipran e imipramina;
- un inibitore della ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) quale S-[2-[(1-imminoetil)ammino]etil]-L-omocisteina, S-[2-[(1-imminoetil)-ammino]etil]-4,4-diosso-L-cisteina, S-[2-[(1-imminoetil)ammino]etil]-2-metil-L-cisteina, acido (2S,5Z)-2-ammino-2-metil-7-[(1-imminoetil)ammino]-5-eptenoico, 2-[[[(1R,3S)-3-

ammino-4-idrossi-1-(5-tiazolil)-butil]tio]-5-cloro-3-piridincarbonitrile; 2-[[[(1R,3S)-3-ammino-4-idrossi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-4-clorobenzonitrile, (2S,4R)-2-ammino-4-[[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]tio]-5-tiazolbutanolo, 2-[[[(1R,3S)-3-ammino-4-idrossi-1-(5-tiazolil) butil]tio]-6-(trifluorometil)-3 piridincarbonitrile, 2-[[[(1R,3S)-3-ammino-4-idrossi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-5-clorobenzonitrile, N-[4-[2-(3-clorobenzilammino)etil]fenil]tiofen-2-carbossamidina, o guanidinoetildisolfuro;

- un inibitore dell'acetilcolinesterasi quale donepezil;
 - un antagonista della prostaglandina E₂ sottotipo 4 (EP4) quale N-[(2-[4-(2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)fenil]etil)ammino)-carbonil]-4-metilbensenzosulfonammide o acido 4-[(1S)-1-({[5-cloro-2-(3-fluorofenossi)piridin-3-il]carbonil}ammino)etil]benzoico;
 - un antagonista del leucotriene B₄; quali acido 1-(3-bifenil-4-ilmetil-4-idrossi-croman-7-il)-ciclopentancarbossilico (CP-105696), acido 5-[2-(2-carbossietil)-3-[6-(4-metossifenil)-5E-esenil]ossifenossi]-valerico (ONO-4057) o DPC-11870,
 - un inibitore della 5-lipossigenasi, quale zileuton, 6-[(3-fluoro-5-[4-metossi-3,4,5,6-tetraidro-2H-piran-4-il])fenossi-metil]-1-metil-2-chinolone (ZD-2138), o 2,3,5-trimetil-6-(3-piridilmetil),1,4-benzochinone (CV-6504);
 - un bloccante il canale del sodio, quale lidocaina; o
 - un antagonista di 5-HT₃, quale ondansetron;
- e i loro sali e solvati farmaceuticamente accettabili.

- Secondo un ottavo aspetto della presente descrizione è fornito un metodo per trattare, prevenire, migliorare, controllare, ridurre l'incidenza di, o ritardare lo sviluppo o la progressione del dolore o di qualsiasi dei precedenti dolori e/o sintomi di dolore in un individuo, comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di p75NTR(NBP) secondo il primo, secondo o settimo aspetto o le loro forme di realizzazione preferite, o la molecola di acido nucleico o il vettore secondo il terzo e quarto aspetto. Preferibilmente l'individuo è un mammifero, ad esempio un animale da compagnia quale cavallo, gatto o cane o un animale da cortile quale pecora, bovino o maiale. In modo massimamente preferibile il mammifero è un essere umano.

- Secondo un nono aspetto della presente descrizione è fornita una composizione farmaceutica per uno qualsiasi o più tra trattamento, prevenzione, miglioramento, controllo, riduzione dell'incidenza, o ritardo nello sviluppo o nella progressione del dolore o di qualsiasi dei precedenti dolori/o sintomi, comprendente p75NTR(NBP) secondo il primo, secondo o settimo aspetto delle sue forme di realizzazione preferite, o la molecola di acido nucleico o il vettore secondo il terzo o quarto aspetto e un veicolante e/o un eccipiente farmaceuticamente accettabili. Preferibilmente p75NTR(NBP) secondo il primo, secondo e settimo aspetto o le forme di realizzazione preferite, o la molecola di acido nucleico o vettore secondo un terzo e quarto aspetto o la composizione farmaceutica del nono aspetto, è preparata o per la somministrazione orale, sublinguale, buccale, topica, rettale, per inalazione, transdermica, sottocutanea, endovenosa, intrarteriosa, intramuscolare, intracardiaca, intraossea, intradermica, intraperitoneale, transmucosale, vaginale, intravitreale, intrarticolare, periarticolare, locale o epicutanea.

Preferibilmente p75NTR(NBP) secondo il primo, secondo o settimo aspetto o le sue forme di realizzazione preferite, o la molecola di acido nucleico o il vettore secondo il terzo e quarto aspetto o la composizione farmaceutica del nono aspetto è preparata per, o adattabile per, la somministrazione prima e/o durante e/o dopo l'insorgenza del dolore o per tale uso.

Preferibilmente p75NTR(NBP) secondo il primo, secondo o settimo aspetto o le sue forme di realizzazione preferite, o la molecola di acido nucleico o il vettore secondo il terzo e quarto aspetto o la composizione farmaceutica del nono aspetto è per o preparata per, la somministrazione tra una volta e 7 volte a settimana, ulteriormente preferibile tra una volta a quattro volte al mese, ulteriormente preferibile tra una volta a sei volte in un periodo di 6 mesi, ulteriormente preferibile da una volta a undici volte l'anno. Preferibilmente il farmaco è ,o deve essere preparato per, la somministrazione periferica in un periodo selezionato tra: una volta al giorno, una volta ogni due, tre, quattro, cinque o sei giorni, settimanalmente, una volta ogni due settimane, una volta ogni tre settimane, mensilmente, una volta ogni due mesi, una volta ogni tre mesi, una volta ogni quattro mesi, una volta ogni cinque mesi, una volta ogni sei mesi, una volta ogni sette mesi, una volta ogni otto mesi, una volta ogni nove mesi, una volta ogni dieci mesi, una volta ogni undici mesi o annualmente.

Ulteriormente preferibile p75NTR(NBP) secondo il primo, secondo o settimo aspetto o le sue forme di realizzazione preferite, o la molecola di acido nucleico o il vettore secondo il terzo e quarto aspetto o la composizione farmaceutica del nono aspetto deve essere, o è preparata per essere, somministrata perifericamente attraverso una via selezionata da una o più tra: somministrazione orale, sublinguale, buccale, topica, rettale, attraverso inalazione, transdermica, sottocutanea, endovenosa, intrarteriosa o intramuscolare, attraverso somministrazione intracardiaca, intraossea, intradermica, intraperitoneale, intramucosale, vaginale, intravitreale, epicutanea, intrarticolare, periarticolare o locale.

Preferibilmente p75NTR(NBP) secondo il primo, secondo o settimo aspetto o le sue forme di realizzazione preferite, o la molecola di acido nucleico o il vettore secondo il terzo e quarto aspetto o la composizione farmaceutica del nono aspetto è per, o è preparata per, la somministrazione a una concentrazione tra circa 0,1 e circa 200 mg/ml; preferibilmente a una qualsiasi di circa 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 mg/ml +/- un errore di circa 10%, in modo massimamente preferibile a circa 50 mg/ml.

Preferibilmente p75NTR(NBP) secondo il primo, secondo o il settimo aspetto o le sue forme di realizzazione preferite, o la molecola di acido nucleico o il vettore secondo un terzo e quarto aspetto o la composizione farmaceutica del nono aspetto è per, o è preparata per, la somministrazione a una concentrazione tra circa 0,1 a circa 200 mg/kg di peso corporeo; preferibilmente ad una qualsiasi di circa 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o circa 200 mg/kg di peso corporeo +/- un errore di circa 10%, in modo massimamente preferibile circa 10 mg/kg.

- Secondo un decimo aspetto della presente descrizione è fornito un kit comprendente:

(a) p75NTR(NBP) secondo il primo, secondo o settimo aspetto o le sue forme di realizzazione preferite, o la molecola di acido nucleico o il vettore secondo il terzo e quarto aspetto o la composizione farmaceutica del nono aspetto; e

(b) istruzioni per la somministrazione di una quantità efficace di detta p75NTR(NBP), molecola di acido nucleico, vettore o composizione farmaceutica a un individuo per uno qualsiasi o più tra prevenzione o

trattamento del dolore e/o dei sintomi del dolore o per miglioramento, controllo, riduzione dell'incidenza di, o ritardo dello sviluppo o progressione del dolore e/o dei sintomi del dolore.

Il kit può includere uno o più contenitori contenenti p75NTR(NBP), acido nucleico, vettore o composizione farmaceutica descritti nella presente e le istruzioni per l'uso secondo qualsiasi dei metodi e usi dell'invenzione. Il kit può comprendere inoltre una descrizione per selezionare un individuo adatto per il trattamento in base all'identificazione se tale individuo ha un dolore o un sintomo del dolore o è a rischio di presentarlo. Le istruzioni per la somministrazione della composizione farmaceutica possono includere informazioni riguardo il dosaggio, il programma di dosaggio e le vie di somministrazione per il trattamento desiderato.

Secondo un undicesimo aspetto della presente descrizione è fornita p75NTR(NBP) secondo il primo, secondo o settimo aspetto o le loro forme di realizzazione preferite, o la molecola di acido nucleico o il vettore secondo il terzo e quarto aspetto o la composizione farmaceutica del nono aspetto per l'uso in una qualsiasi o più tra prevenzione o trattamento per il miglioramento, il controllo, la riduzione dell'incidenza o il ritardo dello sviluppo o della progressione di una condizione o dei sintomi di una condizione associata a una qualsiasi o più tra neurotrofine NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5.

- *NGF (fattore di crescita nervosa)* si lega ad almeno due classi di recettori; p75NTR e TrkA, una tirosin chinasi transmembrana, è implicata nella crescita, nella ramificazione e nell'allungamento assonale. Condizioni e sintomi associati a NGF sono noti. NGF è espresso in, e associato a, condizioni infiammatorie e dolore [Sequenza proteica NP_002497.2, NP_038637]. Inoltre, è stato dimostrato che NGF svolge un ruolo in numerose malattie cardiovascolari, quali aterosclerosi coronarica, obesità, diabete tipo 2 e sindrome metabolica, nonché nella sclerosi multipla. I livelli plasmatici ridotti di NGF (e anche di BDNF) sono stati associati a sindromi coronarie acute e a sindromi metaboliche. NGF è anche associato a diversi disturbi psichiatrici, quali demenza, depressione, schizofrenia, autismo, sindrome di Rett, anoressia nervosa e bulimia nervosa e inoltre è stato implicato nello sviluppo del morbo di Alzheimer e in disturbi neurodegenerativi. È stato anche dimostrato che NGF accelera la guarigione delle ferite e vi è prova che potrebbe essere utile nel trattamento delle ulcere cutanee e delle ulcere corneali, è stato dimostrato che riduce la degenerazione neuronale e favorisce la rigenerazione dei

nervi periferici nei ratti.

- *BDNF (fattore neurotrofico derivato dal cervello)* è una neurotrofina che supporta la sopravvivenza e la crescita neuronale durante lo sviluppo del sistema nervoso [Sequenza Proteica NP_001137277.1, NP_001041604]. BDNF si lega ai recettori di superficie cellulare TrkB e p75NTR e inoltre modula l'attività del recettore alfa-7 nicotino. Le condizioni e i sintomi associati a BDNF sono noti. È stato dimostrato che BDNF svolge un ruolo significativo nella trasmissione del dolore fisiologico e patologico, in particolare in modelli di dolore acuto, dolore infiammatorio e dolore neuropatico, in cui è stato riscontrato che la sintesi di BDNF è fortemente aumentata; inoltre è stato dimostrato che BDNF è regolato positivamente in condizioni di dolore cronico nonché altre condizioni quali eczema e psoriasi. Si osserva la regolazione negativa di BDNF in depressione, schizofrenia, disturbo ossessivo-compulsivo, morbo di Alzheimer, malattia di Huntington, sindrome di Rett e demenza, nonché in anoressia nervosa e bulimia nervosa.

- *Neurotrofina-4 (NT-4), anche nota come neurotrofina-5 (NT-5)*, è un fattore neurotrofico che segnala principalmente attraverso p75NTR e i recettori TrkB e favorisce la sopravvivenza di neuroni simpatici sensoriali periferici. Il peptide maturo di questa proteina è identico in tutti i mammiferi esaminati inclusi essere umano, maiale, ratto e topo. [Sequenza Proteica NP_006170, NP_937833]. NT-4 è sintetizzata dalla maggior parte di neuroni dei gangli della radice dorsale (DRG) e quelli nei gangli simpatici paravertebrali e prevertebrali, nel midollo spinale e corno ventrale ed è riscontrata espressa in molti tessuti inclusi prostata, timo, placenta e muscolo scheletrico. Le condizioni e i sintomi associati a NT-4/5 sono noti. I difetti in NT4/5 sono associati alla predisposizione verso il glaucoma ad angolo aperto primario. È stato dimostrato che la neurotrofina 4 contribuisce alla sopravvivenza delle cellule del cancro mammario ed è un target per inibire la crescita tumorale. È noto che NT-4/5 è implicata nei sistemi di segnalazione del dolore quale dolore nocicettivo, una regolazione positiva di NT-4/5 è anche osservata nelle condizioni infiammatorie croniche della cute, quali dermatite, eczema, lesioni pruriginose di dermatite atopica. Regolazione negativa di NT-4/5 si è osservata in morbo di Alzheimer, malattia di Huntington.

- *Neurotrofina-3 (NT-3)* è una neurotrofina che è strutturalmente associata a beta-NGF, BDNF, e NT-4 e che

controlla la sopravvivenza e la differenziazione dei neuroni di mammifero e il mantenimento del sistema nervoso adulto, e può influenzare lo sviluppo di neuroni nell'embrione quando è espressa nella placenta umana. Le condizioni e i sintomi associati a NT3 sono note. I topi NTF3 - deficienti generati dal targeting genico presentano gravi difetti del movimento degli arti. NT-3 segnala attraverso i recettori Trk e favorisce la crescita e la sopravvivenza delle cellule nervose e gliali [Sequenza Proteica NP_001096124.1 e NP_032768]. Le sequenze amminoacidiche di NT-3 umane, di topo e di ratto sono identiche. È noto che NT3 e il suo recettore affine, tirosin chinasi C (TrkC), modulano il dolore neuropatico e il dolore nocicettivo e il meccanismo della nocicezione e propriocezione, ad esempio l'espressione di NT3 è aumentata nelle piccole cellule DRG degli animali neuropatici. L'espressione di NT3 è inoltre associata alle neuropatie quali polineuropatia diabetica e neuropatia associata all'HIV, neuropatia a grosse fibre includono l'atrofia, è inoltre implicata nello sviluppo dell'iperalgia (una riduzione della soglia degli stimoli normalmente nocivi), dell'allodinia (uno stimolo non nocivo diventa nocivo) e del dolore spontaneo (dolore in apparente assenza di stimoli) ed è un noto modulatore del dolore muscolare.

L'invenzione sarà ora descritta mediante riferimento ai seguenti esempi che sono forniti per illustrare ma non limitare l'invenzione.

I seguenti esempi sono forniti per illustrare ma non limitare l'invenzione.

Esempi

Esempio 1. Complesso neurotrofico-p75NTR(NBP) endogena è rivelato nel plasma umano

Un saggio che utilizza perle magnetiche a base di NGF (Millipore Corp; MA) e l'immunoprecipitazione usando l'anticorpo policlonale di capra anti-NGF umano biotinilato (Novus Biologicals; CO) seguito da SISCAPA (Siscapa <http://siscapa.com/home.html>) quindi successivamente determinato in LC-MS/MS (LLOQ 7 pg/ml) è stato usato per fornire la prova diretta dell'esistenza di un complesso p75NTR/NGF nel plasma umano.

L'anticorpo policlonale anti-NGF, è stato usato per quantificare NGF libero nel siero/plasma umano.

Le sequenze peptidiche (CAYGYQDETTGR (SEQ ID NO. 4) VCEAGSGLVFSCQDK (SEQ ID NO. 6) WADAECEEIPGR (SEQ ID NO. 7)) del dominio extracellulare di p75NTR (come mostrato in Fig. 2) sono state

selezionate come standard di p75NTR mediante LC-MS/MS dopo digestione della chimera di p75NTR. La co-immunoprecipitazione di p75NTR rivelata nel saggio di NGF totale (come sopra descritto) era in grado di dimostrare la presenza dei peptidi di controllo p75NTR fornendo prova di un complesso p75-NGF solubile nel siero umano. Interazioni simili di p75NTR(NBP) e BDNF, NT-3 e NT4/5 sono state anche determinate usando la co-immunoprecipitazione con i rispettivi anticorpi anti-BDNF, anti-NT-3 e anti-NT4/5. Questi studi dimostrano la presenza di una proteina legante p75 neurotrofica solubile nel plasma degli esseri umani legata a NGF, BDNF, NT-3 e NT4/5.

I dati presentati in figura 2 mostrano frammenti standard del peptide p75NTR(NBP) solubile e la co-immunoprecipitazione di p75NTR(NBP) e NGF dimostrando il complesso p75NTR(NBP)-NGF nel plasma umano. È evidente dalle scoperte degli studi di co-immunoprecipitazione di p75NTR(NBP)-NGF nel plasma umano, che i peptidi importanti implicati nel legame nel complesso neurotrofica-p75NTR(NBP) sono: WADAECEEIPGR (SEQ ID NO. 7), CAYGYQDETTGR (SEQ ID NO. 4), VCEAGSGLVFSCQDK (SEQ ID NO. 6), abbiamo inoltre dimostrato che la sequenza LDSVTSDVVSATEPCKP (SEQ ID NO. 8) è anche importante nel legame.

Gli esperimenti sono stati ripetuti con BDNF e NT-3 dimostrando l'importanza delle stesse regioni di legame importanti di p75NTR(NBP) e dimostrando la co-immunoprecipitazione di p75NTR(NBP) con BDNF e NT-3 dimostrando complessi di p75NTR(NBP)-BDNF e p75NTR(NBP)-NT-3 nel plasma umano.

Esempio 2. p75NTR(NBP) solubile inibisce la funzione di NGF nella linea cellulare U20S che esprime TrkA e nella linea cellulare U20S che co-esprime TrkA e p75NTR.

Gli effetti di p75NTR(NBP) sulla funzione di NGF è stata studiata nelle cellule U20S che esprimono TrkA e nelle cellule U20S che co-esprimono TrkA e p75NTR (Discoverx Corp CA). Il saggio è stato eseguito secondo la metodologia di PathHunter (Discoverx Corp CA) in breve, le cellule U20S che esprimono TrkA e TrkA+p75NTR sono state acquistate dalla Discoverx Corporation. Le cellule U20S che esprimono TrkA e le cellule che co-esprimono TrkA+p75NTR sono state piastrate in terreno essenziale minimo (MEM; Sigma Aldrich) + siero di cavallo allo 0,5% (Sigma Aldrich) a una densità di 40.000 cellule/pozzetto e incubate a 37°C

tutta la notte. Le piastre sono state rimosse dall'incubatore 30 minuti prima dell'uso e conservate a temperatura ambiente.

NGF α (Sigma Aldrich) e p75NTR(NBP)-Fc (p75NTR(NBP) SEQ ID NO. 2) si accoppiano a IgG-Fc SEQ ID NO. 12 usando il linker SEQ ID NO 17) o p75NTR(NBP) (p75NTR(NBP) SEQ ID NO. 2) o p75NTR(NBP) accoppiato all'albumina, SEQ ID NO. 10, o p75NTR(NBP) (p75NTR(NBP) SEQ ID NO. 2) accoppiato alla transferrina, SEQ ID NO. 9, sono state diluite in tampone soluzione salina bilanciata di Hanks (HBSS Sigma Aldrich) piú BSA allo 0,25%. NGF è stato diluito in modo seriale ottenendo concentrazioni che variano da 0 nM a 200 nM. P75NTR(NBP) accoppiata a Fc IgG, albumina o transferrina è stata diluita in HBSS ottenendo una concentrazione di p75NTR di 100 ng/ml.

5 μ l di ciascuna delle concentrazioni di NGF (0-200 nM) e 5 μ l di p75NTR(NBP) +/- il veicolante sono stati addizionati a ciascun pozzetto. In un tentativo di comprendere l'effetto sulla pre-incubazione di p75NTR(NBP) +/- veicolante ed NGF sono stati lasciati incubare a temperatura ambiente per 20 minuti prima dell'addizione di 10 μ l di questa miscela in ciascun pozzetto. Immediatamente dopo l'addizione di NGF e p75NTR(NBP) +/- veicolante sono stati addizionati 12 μ l di soluzione di rivelazione (Discoverx Corp CA) a ciascun pozzetto e la piastra è stata lasciata incubare a temperatura ambiente per 60 minuti prima della lettura su un lettore di piastre Parkard Victor 2. Sono state osservate le curve dose-risposta e gli spostamenti nelle curve in risposta all'addizione di p75NTR(NBP). Indipendentemente dal veicolante usato sono stati osservati la soppressione e gli spostamenti nelle curve dose-risposta di NGF di p75NTR(NBP) senza un veicolante, p75NTR(NBP)-Fc, p75NTR(NBP)-albumina o p75NTR(NBP)-transferrina (si veda Figura 4).

Esempio 3. p75NTR(NBP) inibisce la funzione di BDNF nella linea cellulare U20S che esprime TrkB e nella linea cellulare U20S che co-esprime TrkB e p75NTR.

Gli effetti di p75NTR(NBP) sulla funzione di BDNF sono stati studiati nelle cellule U20S che esprimono TrkB e nelle cellule U20S che co-esprimono TrkB e p75NTR (Discoverx Corp CA). Il saggio è stato eseguito secondo la metodologia di PathHunter (Discoverx Corp CA) in breve, le cellule U20S che esprimono TrkB e TrkB+p75NTR sono state acquistate dalla Discoverx Corporation. Le cellule U20S che esprimono TrkB e le

cellule che co-esprimono TrkB+p75NTR sono state piastrate in terreno essenziale minimo (MEM; Sigma Aldrich) + siero di cavallo allo 0,5% (Sigma Aldrich) a una densità di 40.000 cellule/pozzetto e incubate a 37°C tutta la notte. La piastra è stata rimossa dall'incubatore 30 minuti prima dell'uso e conservata a temperatura ambiente.

BDNF α (Sigma Aldrich) e p75NTR(NBP)-Fc (p75NTR(NBP) SEQ ID NO. 2) si accoppiano a IgG-Fc SEQ ID NO. 12 usando il linker SEQ ID NO 17) o p75NTR(NBP) (p75NTR(NBP) SEQ ID NO. 2) o p75NTR(NBP) accoppiato ad albumina, SEQ ID NO. 10, o p75NTR(NBP) (p75NTR(NBP) SEQ ID NO. 2) accoppiato a transferrina, SEQ ID NO. 9, sono stati diluiti in tampone soluzione salina bilanciata di Hanks (HBSS Sigma Aldrich) più BSA allo 0,25%. BDNF è stato diluito in modo seriale ottenendo concentrazioni che variano da 0 nM a 200 nM. P75NTR(NBP) accoppiato a Fc-IgG, albumina o transferrina è stata diluita in HBSS ottenendo una concentrazione di p75NTR(NBP) 100 ng/ml.

5 μ l di ciascuna delle concentrazioni di BDNF (0-200nM) e 5 μ l di p75NTR(NBP) +/- veicolante sono stati addizionati a ciascun pozzetto. In un tentativo di comprendere l'effetto sulla pre-incubazione p75NTR(NBP)+/- veicolante e BDNF sono stati lasciati incubare a temperatura ambiente per 20 minuti prima dell'aggiunta di 10 μ l di questa miscela in ciascun pozzetto. Immediatamente dopo l'aggiunta di BDNF e p75NTR(NBP) +/- veicolante sono stati addizionati 12 μ l di soluzione di rivelazione (Discoverx Corp CA) in ciascun pozzetto e la piastra è stata lasciata incubare a temperatura ambiente per 60 minuti prima della lettura su un lettore di piastra Parkard Victor 2. Sono state osservate curve dose-risposta e gli spostamenti nelle curve in risposta all'aggiunta di p75NTR(NBP). Indipendentemente dal veicolante usato sono stati osservati la soppressione di p75NTR(NBP) senza un veicolante, p75NTR(NBP)-Fc, p75NTR(NBP)-albumina o p75NTR(NBP)-transferrina e gli spostamenti nelle curve dose-risposta di BDNF (si veda Fig. 5).

Esempio 4. Dati Biocore che dimostrano il legame di p75NTR(NBP) a BDNF e la competizione tra l'anticorpo anti-BDNF e p75NTR(NBP). P75-Fc (p75NTR(NBP)-Fc), (500 μ g/ml) è stata diluita a una concentrazione di 25 μ g/ml in acetato 10 mM pH 5.0 e immobilizzata su un chip Biocore usando il tampone di corsa HBS-P (0,005% di P20) + 1 mg/ml di BSA. È stata preparata una soluzione stock di BDNF (dai sistemi R e D) 2 μ M in tampone

HBS-P (0,005% di P20) + 1 mg/ml di BSA. L'esperimento di competizione di BDNF è stato eseguito con p75 e la presenza o l'assenza di MAB248 (anticorpo anti-BDNF RandD systems) alle seguenti concentrazioni: i) MAB248 (500nM) da solo, ii) BDNF (20nM) + MAB248 (500nM), iii) BDNF (20nM) da solo e iv) BDNF (20nM) + MAB248 (100nM). Tutti i campioni sono stati preparati da soluzioni stock e diluiti in tampone di corsa; HBS-P (0,005% di P20) + 1mg/ml di BSA. Tutti i campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per 30 minuti prima dell'iniezione. Un sensorgramma manuale è stato avviato attraverso il chip biocore a una portata di 50ul/min. ciascun campione è stato iniettato per 30 secondi nell'ordine sopra elencato in un ciclo di sensorgramma separato. La rigenerazione è stata realizzata quando necessario con un ciclo di NaOH 5mM per 12 secondi (10ul). Come illustrato in Fig. 6 p75NTR(NBP) si lega a BDNF.

Esempio 5. Inibizione mediante p75NTR(NBP) dell'attività NGF nelle cellule PC12

È stato dimostrato che p75NTR(NBP) inibisce in modo significativo l'attività di NGF nelle cellule PC-12 e N2OS che esprimono TrkA e/o TrkB più p75 sulla superficie cellulare, Figura 7.

Cellule PC12 a basso numero di passaggi (numero di passaggi 20-24) sono state fatte crescere direttamente su piastre a 96 pozzetti in terreno di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM) integrato con siero bovino fetale al 5% e siero di cavallo attivato a calore al 10% e penicillina-streptomicina (10 U/ ml-0,1 mg/ml), e incubate in un'atmosfera umidificata contenente CO₂ al 5%, 37°C. È stato addizionato NGF (50 ng/ml) al terreno di crescita per differenziare le cellule PC12. Una concentrazione di dose di P75NTR(NBP) di 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,1, 1,5, 0,78, 0,39, 0,2, 0,1 ng/ml è stata addizionata a ciascun pozzetto in tutta la piastra. La piastra è stata incubata a 37°C per 24 ore dopodiché il numero di cellule è stato determinato mediante un contatore cellulare. Come mostrato in Figura 8 l'addizione di p75NTR(NBP) nel terreno bloccava in modo significativo la differenziazione delle cellule PC-12 nel loro fenotipo assonale. In presenza di NGF le cellule PC-12 si differenziano e formano un fenotipo neuronale simile. Questo è stato inibito in un modo dose-dipendente in risposta a p75NTR(NBP). Si è concluso da questi studi che p75NTR(NBP) blocca l'azione di NGF.

Esempio 6. Proteina di legame neurotrofico p75NTR(NBP) inibisce l'effetto di BDNF nell'iperalgia meccanica in un modello di eccitabilità nervosa.

Ratti Sprague Dawley maschi sono stati anestetizzati con isoflurano (5% in ossigeno per l'induzione, 1,5-2,0% in ossigeno per il mantenimento). Il midollo spinale è stato esposto mediante laminectomia lombare per scoprire la regione L4-L6 del midollo e un microelettrodo di tungsteno è stato inserito nel corno dorsale per la registrazione da un neurone ad ampio range dinamico isolato. Singoli neuroni WDR sono stati isolati in modo che l'ampiezza del potenziale d'azione (spike) dell'unità registrata fosse almeno 3x il livello del rumore basale. Le risposte sono state amplificate usando un amplificatore accoppiato in AC e registrati usando il software CED spike2. Prima dell'applicazione del farmaco, sono state ottenute 3 risposte basali stabili (variazione <10%) in un range di stimoli naturali (sfregamento von Frey, pizzicotto e calore). Lo stimolo di sfregamento è stato applicato strofinando il centro del campo ricettivo periferico con un batuffolo di cotone fine. Il filamento di von Frey e il calore (usando un getto d'acqua costante impostata a 43 gradi) sono stati applicati per un periodo di 10 secondi. Il pizzicotto è stato applicato per un periodo di 5 secondi. Una volta ottenute risposte basali stabili, BDNF da sola (500 ng in BSA allo 0,1%) o BDNF (500 ng) + p75NTR(NBP) (500 ng pre-incubati per 40 minuti prima dell'iniezione) sono state applicate al centro del campo ricettivo in un volume di 25 μ l usando una siringa per insulina. Gli effetti del farmaco sono stati seguiti per 150 minuti e i test realizzati a intervalli di 10 minuti. Al termine dell'esperimento il ratto è stato eliminato mediante dislocazione cervicale.

Come dimostrato in fig. 8, BDNF provocava un aumento significativo dell'eccitabilità neuronale e questa è stata amplificata dopo lo stimolo. L'aggiunta di p75NTR(NBP) riduceva significativamente l'eccitabilità neuronale in risposta a tutti gli stimoli; soluzione salina, BDNF, sfregamento e pizzicotto. È evidente che p75NTR(NBP) riduce l'eccitabilità neuronale e successivamente il dolore.

Esempio 7 – Proteina di legame neurotrofica P75NTR(NBP) inibisce l'iperalgia in un modello UVIH

Esposizione degli animali a UV

I ratti Sprague Dawley maschi Charles River (175-200 g) sono stati anestetizzati con una miscela di isoflurano O₂ al 2%. L'anestesia è stata mantenuta attraverso un nose cone (cono nasale) mentre la superficie plantare della zampa posteriore destra veniva irradiata con 300 mJ/cm² di UV (Saalman CupCube system, Saalman GmbH, Germania; λ =280-400 nm). La sorgente di irradiazione è stata adattata alla superficie plantare della zampa

posteriore del ratto usando un collare di rilascio formato (8x12mm), attaccato alla sorgente UV (Pfizer Facilities Management and Engineering Team). L'intensità di sorgenti UV è stata calibrata usando il radiometro ABLE 1400A con il filtro SEL005/WBS320/TD (ABLE Instruments e Controls Ltd). L'esposizione UV usata, provoca eritema cutaneo in ratti naive e nessun altro evento negativo (nessuna perdita di peso corporeo, nessun segno di stress o ovvio malessere).

Valutazione dell'iperalgia termica

L'iperalgia termica è stata valutata usando il test plantare su ratto (Ugo Basile, Italia) dopo un metodo modificato di Hargreaves et al (1988). I ratti sono stati abituati all'apparato (15-30 minuti) prima del test. Il test plantare era costituito da tre singole scatole di perspex su un piano di vetro elevato. Due ratti sono stati alloggiati in ciascuna scatola in modo che se 6 ratti/apparato possano essere testati simultaneamente.

Una sorgente di calore a infrarossi mobile è stata applicata direttamente al di sotto della superficie plantare della zampa posteriore del ratto. La latenza del ritiro della zampa (PWL) è stata definita come il tempo (secondi) trascorso dal ratto per rimuovere la sua zampa posteriore dalla sorgente di calore. La sorgente è stata calibrata per ottenere una risposta di 8-12 sec sugli animali non trattati (105-120mW/cm²). È stato impostato un punto di cut off automatico di 20 sec per prevenire il danno tissutale.

Le cinque registrazioni sono state acquisite da ciascuna zampa posteriore del ratto durante le misurazioni basali (ratti naive prima dell'esposizione a UV, giorno 0) e conferma dell'insorgenza di iperalgia (giorno 1). Due sessioni al giorno sono state eseguite il giorno 0 e 1.

Tre registrazioni per zampa sono state invece raccolte per i basali e ciascun punto di test durante la valutazione dell'efficacia dei farmaci il giorno 2, 3 e 4 (48, 72 e 96 ore post esposizione a UV, rispettivamente). La zampa non lesionata era stata sempre valutata prima.

Iperalgia termica è definita come animali che mostrano PWL media ≤ 5 sec, che sono selezionati per gli studi.

Valutazione dell'allodinia statica

Gli animali sono stati abituati a gabbie di test con fondo reticolato prima della valutazione dell'allodinia. Gli animali hanno familiarizzato con i filamenti di von Frey mediante applicazione di un filamento da 15 g, 8 g, + 4

g il 1° giorno di ambientazione, filamento da 4 g il 2° giorno prima di eseguire una misurazione full up down. L'allodinia statica è valutata mediante applicazione dei filamenti di von Frey (Stoelting, Wood Dale, Illinois, U.S.A.) in ordine ascendente di forza (0,6, 1, 1,4, 2, 4, 6, 8, 10, 15 e 26 grammi) sulla superficie plantare delle zampe posteriori. Ciascun filamento di von Frey è applicato alla zampa per un massimo di 6 secondi, o fino alla manifestazione della risposta di ritiro. Una volta determinata la risposta di ritiro a un filamento di von Frey, la zampa è ritestata, partendo con un filamento al di sotto di quello che produceva un ritiro, e successivamente con i filamenti rimanenti in una sequenza di forza discendente fino a quando non si manifesta il ritiro. La forza massima di 26 g fa sollevare la zampa nonché stimola una risposta, rappresentando così il punto di cut off. A ciascun animale vengono testate ambedue le zampe posteriori in questo modo. La quantità minima di forza necessaria a stimolare una risposta è registrata come soglia di ritiro della zampa (PWT) in grammi. L'allodinia statica è definita come presente se gli animali rispondono a uno stimolo di, o inferiore a, 4 g, che è innocuo in ratti normali.

Sugli animali vengono eseguiti test basali prima del test e quelli che presentano allodinia che soddisfa i criteri di inclusione sono randomizzati in base a PWL e sono sottoposti a dosaggio. Il composto di test è dosato e in tempi predeterminati (in base alle proprietà farmacocinetiche del composto di test), dopo la misurazione del dosaggio sono eseguiti in tempi selezionati post dosaggio e tutti i dati sono raccolti per l'analisi. Come dimostrato in figura 9 i dati di PWL per 10 mg/kg di p75NTR(NBP) per via sottocutanea (indicata NBPP-Fc) sono mostrati rispetto al controllo, 100 mg/kg di ibuprofene po e 10 mg/kg di anticorpo anti-NGF per via sottocutanea, i dati per la valutazione dell'iperalgia termica mostravano misure equivalenti in ciascun caso.

Citazioni

- Armour KL, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM. 1999. Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol.* 29(8):2613-24.
- Barthel C, Yeremenko N, Jacobs R, Schmidt RE, Bernateck M, Zeidler H, Tak PP, Baeten D, Rihl M. 2009. Nerve growth factor and receptor expression in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther.* 11:R82.
- Bothwell MA, Shooter EM. 1977. Dissociation equilibrium constant of beta nerve growth factor. *J Biol Chem* 252:8532-8536.
- Chu C, Levine E, Gear RW, Bogen O, Levine JD. 2011. Mitochondrial dependence of nerve growth factor-induced mechanical hyperalgesia. *Pain.* 152:1832-7.
- Cirillo G, Cavaliere C, Bianco MR, De Simone A, Colangelo AM, Sellitti S, Alberghina L, Papa M. 2010. Intrathecal NGF administration reduces reactive astrogliosis and changes neurotrophin receptors expression pattern in a rat model of neuropathic pain. *Cell Mol Neurobiol.* 30:51-62.
- Cowan, W.M. 2001. Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: the path to the discovery of nerve growth factor. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:551-600.
- Fukui Y, Ohtori S, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Suzuki M, Orita S, Eguchi Y, Ochiai N, Kishida S, Takaso M, Wakai K, Hayashi Y, Aoki Y, Takahashi K. 2010. Low affinity NGF receptor (p75 neurotrophin receptor) inhibitory antibody reduces pain behavior and CGRP expression in DRG in the mouse sciatic nerve crush model. *J Orthop Res.* 2010; 28:279-83.
- Ghilardi JR, Freeman KT, Jimenez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, Bouhana KS, Trollinger D, Winkler J, Lee P, Andrews SW, Kuskowski MA, Mantyh PW. 2010. Sustained blockade of neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC reduces non-malignant skeletal pain but not the maintenance of sensory and sympathetic nerve fibers. *Bone.* 48:389-98.
- Hayashi K, Ozaki N, Kawakita K, Itoh K, Mizumura K, Furukawa K, Yasui M, Hori K, Yi SQ, Yamaguchi T, Sugiura Y. 2011. Involvement of NGF in the Rat Model of Persistent Muscle Pain Associated With Taut Band. *J Pain.* 12:1059-68.
- He XL, Garcia KC. 2004. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor

p75. *Science* 304:870-875.

Huang EJ, Reichardt LF. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 72:609-42

Huang YZ, Pan E, Xiong ZQ, McNamara JO. 2008. Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. *Neuron* 57:546-558.

Iwakura N, Ohtori S, Orita S, Yamashita M, Takahashi K, Kuniyoshi K. 2010. Role of low-affinity nerve growth factor receptor inhibitory antibody in reducing pain behavior and calcitonin gene-related Peptide expression in a rat model of wrist joint inflammatory pain. *J Hand Surg Am.* 35:267-73.

Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, et al. 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47:545-554.

Jung KM, Tan S, Landman N, Petrova K, Murray S, Lewis R, Kim PK, et al. 2003. Regulated intra-membrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J Biol Chem* 278:42161-42169.

Kanning KC, Hudson M, Amieux PS, Wiley JC, Bothwell M, Schecterson LC. 2003. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* 23:5425-5436.

Kenchappa RS, Zampieri N, Chao MV, Barker PA, Teng HK, Hempstead BL, Carter BD. 2006. Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* 50:219-232.

McDonald CL, Bandtlow C, Reindl M. 2011. Targeting the Nogo receptor complex in diseases of the central nervous system. *Curr Med Chem.* 18:234-44.

Orita S, Ohtori S, Nagata M, Horii M, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Suzuki M, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Ishikawa T, Miyagi M, Ochiai N, Kishida S, Takaso M, Aoki Y, Takahashi K. 2010. Inhibiting nerve growth factor or its receptors downregulates calcitonin gene-related peptide expression in rat lumbar dorsal root ganglia innervating injured intervertebral discs. *J Orthop Res.* Dec; 28:1614-20.

- Pezet S, Onténiente B, Jullien J, Junier MP, Grannec G, Rudkin BB, Calvino B. 2010. Differential regulation of NGF receptors in primary sensory neurons by adjuvant-induced arthritis in the rat. *Pain*. 90:113-25.
- Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM. 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* 325:593-597.
- Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Atkuri KR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. 2011. Nerve growth factor: A key local regulator in the pathogenesis of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 Jul 26.
- Svensson P, Wang MW, Dong XD, Kumar U, Cairns BE. 2010. Human nerve growth factor sensitizes masseter muscle nociceptors in female rats. *Pain*. Mar; 148:473-80.
- Tria MA, Fusco M, Vantini G, Mariot R. 1994. Pharmacokinetics of nerve growth factor (NGF) following different routes of administration to adult rats. *Exp Neurol*. 127(2): 178-83
- Truzzi F, Marconi A, Atzei P, Panza MC, Lotti R, Dallaglio K, Tiberio R, Palazzo E, Vaschieri C, Pincelli C. 2011. p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes. *Cell Death Differ*. Jun;18:948-58.
- Ueda K, Hirose M, Murata E, Takatori M, Ueda M, Ikeda H, Shigemi K. 2010. Local administration of a synthetic cell-penetrating peptide antagonizing TrkA function suppresses inflammatory pain in rats. *J Pharmacol Sci*.;112:438-43.
- Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Reversi A, Klos-Applequist JM, Karaca E, Simi A, et al. 2009a. Ligand-independent signaling by disulfide-crosslinked dimers of the p75 neurotrophin receptor. *J Cell Sci* 122:3351-3357.
- Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Simi A, Karaca E, Reversi A, Choi S. 2009b. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* 62:72-83.
- Watanabe T, Ito T, Inoue G, Ohtori S, Kitajo K, Doya H, Takahashi K, Yamashita T. 2010. The p75 receptor is associated with inflammatory thermal hypersensitivity. *J Neurosci Res*. 2008 Dec; 86:3566-74
- Yamaoka J, Di ZH, Sun W, Kawana S. 2007. Changes in cutaneous sensory nerve fibers induced by skin-

scratching in mice. J Dermatol Sci. Apr;46(1):41-51

ELENCO SEQUENZE

<110> LEVICEPT LTD
<120> USO TERAPEUTICO DELLA PROTEINA LEGANTE LA NEUROTROFINA P75NTR
<130> LEVI01102WO.e1
<150> 60/610,682
<151> 2012-03-14
<160> 19
<170> PatentIn versione 3.5
<210> 1
<211> 427
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys
20 25 30
Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn
35 40 45
Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys
50 55 60
Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr
65 70 75 80
Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser
85 90 95
Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly
100 105 110
Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys
115 120 125
Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr
130 135 140
Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His
145 150 155 160
Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln

165 170 175

Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro
180 185 190

Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr
195 200 205

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

Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln
225 230 235 240

Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys
245 250 255

Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe
260 265 270

Lys Arg Trp Asn Ser Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser Arg
275 280 285

Pro Val Asn Gln Thr Pro Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser Asp
290 295 300

Ser Gly Ile Ser Val Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Pro His
305 310 315 320

Thr Gln Thr Ala Ser Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Gly Leu Tyr
325 330 335

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 250
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser
85 90 95

Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly
100 105 110

Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys
115 120 125

Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr
130 135 140

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

Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln
165 170 175

Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro
180 185 190

Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr
195 200 205

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

Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln
225 230 235 240

Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn
245 250

<210> 3
<211> 221
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5
<211> 49
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

Arg

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Pro

<210> 9
<211> 698
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10
<211> 609
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu

<210> 11
<211> 212
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
210

<210> 12
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 13
<211> 165
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Ser Gly Gly
165

<210> 14
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 15
<211> 209
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 16
<211> 225
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys
225

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificiale

<220>
<223> Sequenza linker

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (5)
<223> (GGGS)n (n = da 3 a 4)

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificiale

<220>
<223> Sequenza linker

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (5)
<223> (EAAAK)n (n = da 2 a 5)

<400> 18

Glu Ala Ala Ala Lys
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificiale

<220>
<223> Sequenza linker

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

RIVENDICAZIONI

1. Proteina legante la neurotrofina p75NTR, in cui p75NTR(NBP) si lega a qualsiasi tra NGF, BDNF, NT3 o NT4/5 con un'affinità di legame (K_d) tra 0,1 nM e 50 nM come misurato mediante risonanza plasmonica di superficie a 20°C, per l'uso nel trattamento del dolore.
2. p75NTR(NBP) per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui p75NTR(NBP) comprende (a) p75NTR(NBP) connessa a una o più molecole ausiliarie selezionate tra:
 - (a) transferrina o una sua porzione,
 - (b) albumina o una sua porzione,
 - (c) un Fc immunoglobulinico o una sua porzione,
 - (d) una catena polimerica glicole polietilenico.
3. p75NTR(NBP) per l'uso secondo la rivendicazione 2 in cui, p75NTR(NBP) è connessa a una o più molecole ausiliarie attraverso uno o più linker.
4. p75NTR(NBP) per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui p75NTR(NBP) è un p75NTR(NBP) umana.
5. p75NTR(NBP) per l'uso secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni in cui p75NTR(NBP) comprende uno o più tra dominio 1 [SEQ ID NO. 4], 2 [SEQ ID NO. 5], 3 [SEQ ID NO. 6], 4 [SEQ ID NO. 7] o 5 [SEQ ID NO. 8] leganti la neurotrofina.
6. p75NTR(NBP) per l'uso secondo qualsiasi precedente rivendicazione in cui p75NTR(NBP) comprende
 - (a) una o più tra SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8,
 - (b) SEQ ID NO. 3 o una sua porzione comprendente (a), o
 - (c) SEQ ID NO. 2 o una sua porzione comprendente (a).
7. p75NTR(NBP) per l'uso secondo le rivendicazioni da 2 a 6 in cui il linker è selezionato tra:
 - (a) un legame covalente,
 - (b) un legame non covalente,
 - (c) un legame peptidico,

(d) un amminoacido o una pluralità di amminoacidi comprendente un peptide.

8. p75NTR(NBP) per l'uso secondo qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 6 in cui p75NTR(NBP) è connessa a più di una molecola ausiliaria, opzionalmente ciascuna molecola ausiliaria è uguale o differente o una miscela delle molecole uguali o differenti.

9. p75NTR(NBP) per l'uso secondo la rivendicazione 8, in cui più di una molecola ausiliaria comprende un multimerico di molecole ausiliarie legate a p75NTR(NBP) attraverso un linker, e in cui ciascuna molecola può essere uguale o differente o una miscela delle molecole uguali e differenti.

10. p75NTR(NBP) per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9 in cui p75NTR(NBP) è costituita da

(a) una p75NTR(NBP) di sequenza SEQ ID No 3, e opzionalmente

(b) un Fc immunoglobulinico, opzionalmente in cui l'Fc immunoglobulinico è selezionato tra SEQ ID No. 12, 15 e 16, e opzionalmente inoltre

(c) un linker, opzionalmente in cui il linker è selezionato tra SEQ ID No. 17, 18 e 19.

11. Proteina legante la neurotrofina p75NTR, p75NTR(NBP), in cui p75NTR(NBP) comprende uno o più tra dominio 1 [SEQ ID NO. 4], 2 [SEQ ID NO. 5], 3 [SEQ ID NO. 6], 4 [SEQ ID NO. 7] o 5 [SEQ ID NO. 8] leganti la neurotrofina per l'uso nel trattamento del dolore.

12. p75NTR(NBP) per l'uso secondo la rivendicazione 11 in cui p75NTR(NBP) comprende

(a) una o più tra SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 8,

(b) SEQ ID NO. 3 o una sua porzione comprendente (a), o

(c) SEQ ID NO. 2 o una sua porzione comprendente (a).

13. p75NTR(NBP) per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui il dolore o il sintomo di dolore è selezionato tra:

(a) dolore acuto e/o dolore spontaneo,

(b) dolore cronico e/o dolore continuo,

(c) dolore infiammatorio incluso uno qualsiasi tra dolore artritico, dolore derivato da osteoartrite o artrite

reumatoide, derivato da malattie infiammatorie dell'intestino,

(d) dolore nocicettivo,

(e) dolore neuropatico, inclusa la neuropatia diabetica dolorosa o dolore associato alla nevralgia post-erpetica,

(f) iperalgesia,

(g) allodinia,

(h) dolore centrale, dolore centrale post-ictus, dolore derivante da sclerosi multipla, dolore derivante da lesione del midollo spinale, dolore derivante da morbo di Parkinson o epilessia,

(i) dolore da cancro,

(j) dolore post-operatorio,

(k) dolore viscerale, incluso dolore viscerale dell'apparato digerente, e dolore viscerale dell'apparato non digerente, dolore dovuto a disturbi gastrointestinali (GI), dolore derivante da disturbi funzionali dell'intestino (FBD), dolore derivante da malattia infiammatoria dell'intestino (IBD), dolore derivante da dismenorrea, dolore pelvico, cistite, cistite interstiziale o pancreatite,

(l) dolore muscolo-scheletrico, mialgia, fibromialgia, spondilite, artropatie sieronegative (non reumatoidi), reumatismo non articolare, distrofinopatia, glicogenolisi, polimiosite, piomiosite,

(m) dolore cardiaco o vascolare, dolore dovuto ad angina, infarto miocardico, stenosi mitralica, pericardite, fenomeno di Raynaud, scleredema, scleredema o ischemia dei muscoli scheletrici,

(n) dolore alla testa inclusa emicrania, emicrania con aura, emicrania senza aura, cefalea a grappolo, cefalea di tipo tensivo,

(o) dolore orofacciale, incluso dolore dentale, dolore miofasciale temporomandibolare o tinnito, o

(p) dolore lombare, borsite, dolore mestruale, emicrania, dolore riferito, nevralgia del trigemino, ipersensibilizzazione, dolore derivante da trauma spinale e/o degenerazione o ictus.

14. p75NTR(NBP) per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui p75NTR(NBP) è per l'uso separato, sequenziale o simultaneo in una combinazione combinata con un secondo composto farmacologicamente attivo, preferibilmente in cui il secondo composto farmacologicamente attivo della

combinazione è selezionato tra:

- un analgesico oppioide, ad es. morfina, eroina, idromorfone, ossimorfone, levorfanolo, levallorfanolo, metadone, meperidina, fentanile, cocaina, codeina, diidrocodeina, ossicodone, idrocodone, propofene, nalmefene, nalorfina, naloxone, naltrexone, buprenorfina, butorfanolo, nalbufina o pentazocina;
- un farmaco antinfiammatorio non steroideo (FANS), ad es., aspirina, diclofenac, diflusal, etodolac, fenbufene, fenopropene, flufenisal, flurbiprofene, ibuprofene, indometacina, chetoprofene, chetorolac, acido meclofenammico, acido mefenammico, meloxicam, nabumetone, naproxene, nimesulide, nitroflurbiprofene, olsalazina, ossaprozina, fenilbutazone, piroxicam, solfasalazina, sulindac, tolmetina o zomepirac;
- un sedativo barbiturico, ad es., amobarbital, aprobarbital, butobarbital, butabital, mefobarbital, metarbital, metoexital, pentobarbital, fenobarbital, secobarbital, talbutal, teamilal o tiopental;
- una benzodiazepina avente un'azione sedativa, ad es., clordiazepossido, clorazepato, diazepam, flurazepam, lorazepam, ossazepam, temazepam o triazolam;
- un antagonista del recettore H₁ avente un'azione sedativa, ad es. difenidramina, pirilamina, prometazina, clorfeniramina o clorciclizina;
- un sedativo quale glutetimide, meprobamato, metaqualone o dicloralfenazone;
- un miorilassante scheletrico, ad es., baclofene, carisoprodolo, clorzossazone, ciclobenzaprina, metocarbamolo o orfrenadina;
- un antagonista del recettore NMDA, ad es., destrometorfano ((+)-3-idrossi-N-metilmorfina) o suo metabolita dextrofan ((+)-3-idrossi-N-metilmorfina), chetamina, memantina, pirrolochinolina chinina, acido cis-4-(fosfonometil)-2-piperidincarbossilico, budipina, EN-3231 (MorphiDex®, una formulazione combinata di morfina e destrometorfano), topiramato, neramexano o perzinfotel incluso un antagonista di NR2B, ad es. ifenprodil, traxoprodil o (-)-(R)-6-{2-[4-(3-fluorofenil)-4-idrossi-1-piperidinil]-1-idrissietil-3,4-diidro-2(1H)-chinolinone};
- un alfa-adrenergico, ad es. doxazosina, tamsulosina, clonidina, guanfacina, dexmetatomidina, modafinil, o 4-ammino-6,7-dimetossi-2-(5-metan-solfonammido-1,2,3,4-tetraidroisochinol-2-il)-5-(2-piridil)-chinazolina;

- un antidepressivo triciclico, ad es., desipramina, imipramina, amitriptilina o nortriptilina;
- un anticonvulsivo, ad es., carbamazepina, lamotrigina, topiramato o valproato;
- un antagonista della tachichinina (NK), in particolare un antagonista di NK-3, NK-2 o NK-1, ad es., (α R,9R)-7-[3,5-bis(trifluorometil)benzil]-8,9,10,11-tetraidro-9-metil-5-(4-metilfenil)-7H-[1,4]diazocino[2,1-g][1,7]-naftiridin-6-13-dione (TAK-637), 5-[[[(2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etossi-3-(4-fluorofenil)-4-morfolinil]-metil]-1,2-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-one (MK-869), aprepitant, lanepitant, dapitant o 3-[[2-metossi-5-(trifluorometossi)fenil]-metilammino]-2-fenilpiperidina (2S,3S);
- un antagonista muscarinico, ad es., ossibutinina, tolterodina, propiverina, tropsio cloruro, darifenacina, solifenacina, temiverina e ipratropio;
- un inibitore selettivo di COX-2, ad es., celecoxib, rofecoxib, parecoxib, valdecoxib, deracoxib, etoricoxib, o lumiracoxib;
- un analgesico a base di catrame di carbone, in particolare paracetamolo;
- un neurolettico quale droperidolo, clorpromazina, aloperidolo, perfenazina, tioridazina, mesoridazina, trifluoperazina, flufenazina, clozapina, olanzapina, risperidone, ziprasidone, quetiapina, sertindolo, aripiprazolo, sonepiprazolo, blonanserina, iloperidone, perospirone, raclopride, zotepina, bifeprunox, asenapina, lurasidone, amisulpride, balaperidone, palindore, eplivanserina, osanetant, rimonabant, meclinetant, Miraxion® o sarizotan;
- un agonista (ad es. resiniferatossina) o antagonista (ad es., capsazepina) del recettore vanilloide;
- un beta-adrenergico quale propranololo;
- un anestetico locale quale mexiletina;
- un corticosteroide quale desametasone;
- un agonista o antagonista del recettore 5-HT, in particolare un agonista 5-HT_{1B/1D} quale eletriptan, sumatriptan, naratriptan, zolmitriptan o rizatriptan;
- un antagonista del recettore 5-HT_{2A} quale R(+)-alfa-(2,3-dimetossi-fenil)-1-[2-(4-fluorofenilettil)]-4-piperidinmetanolo (MDL-100907);
- un analgesico colinergico (nicotinico), quali ispronclina (TC-1734), (E)-N-metil-4-(3-piridinil)-3-buten-1-

ammina (RJR-2403), (R)-5-(2-azetidilmetossi)-2-cloropiridina (ABT-594) o nicotina;

- Tramadol®;
- un inibitore di PDEV, quali 5-[2-etossi-5-(4-metil-1-piperazinil-solfonil)fenil]-1-metil-3-n-propil-1,6-diidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-one (sildenafil), (6R,12aR)-2,3,6,7,12,12a-esaidro-2-metil-6-(3,4-metilendiossifenil)-pirazino[2',1':6,1]-pirido[3,4-b]indol-1,4-dione (IC-351 o tadalafil), 2-[2-etossi-5-(4-etil-piperazin-1-il-1-solfonil)-fenil]-5-metil-7-propil-3H-imidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4-one (vardenafil), 5-(5-acetil-2-butossi-3-piridinil)-3-etil-2-(1-etil-3-azetidil)-2,6-diidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-one, 5-(5-acetil-2-propossi-3-piridinil)-3-etil-2-(1-isopropil-3-azetidil)-2,6-diidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-one, 5-[2-etossi-5-(4-etilpiperazin-1-ilsolfonil)piridin-3-il]-3-etil-2-[2-metossietil]-2,6-diidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-one, 4-[(3-cloro-4-metossibenzil)ammino]-2-[(2S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-il]-N-(pirimidin-2-ilmetil)pirimidin-5-carbossammide, 3-(1-metil-7-osso-3-propil-6,7-diidro-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)-N-[2-(1-metilpirrolidin-2-il)etil]-4-propossibenzensolfonammide;
- un cannabinoide;
- un antagonista del recettore metabotropico del glutammato sottotipo 1 (mGluR1);
- un inibitore della ricaptazione della serotonina quale sertralina, metabolita della sertralina demetilsertalina, fluoxetina, norfluoxetina (metabolita fluoxetina desmetile), fluvoxamina, paroxetina, citalopram, metabolita di citalopram desmetilcitalopram, escitalopram, d,l-fenfluramina, femoxetina, ifoxetina, cianodotiepina, litoxetina, dapoxetina, nefazodone, cericlamina e trazodone;
- un inibitore della ricaptazione della noradrenalina (norepinefrina), quali maprotilina, lofepramina, mirtazepina, ossaprotilina, fezolamina, tomoxetina, mianserina, bupropione, metabolita del bupropione idrossibupropione, nomifensina e viloxazina (Vivalan®), in particolare un inibitore selettivo della ricaptazione della noradrenalina quale reboxetina, in particolare (S,S)-reboxetina;
- un inibitore doppio della ricaptazione della serotonina-noradrenalina, quali venlafaxina, metabolita della venlafaxina O-desmetilvenlafaxina, clomipramina, metabolita della clomipramina desmetilclomipramina, duloxetina, milnacipran e imipramina;

- un inibitore della ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) quali S-[2-[(1-imminoetil)ammino]etil]-L-omocisteina, S-[2-[(1-imminoetil)-ammino]etil]-4,4-diosso-L-cisteina, S-[2-[(1-imminoetil)ammino]etil]-2-metil-L-cisteina, acido (2S,5Z)-2-ammino-2-metil-7-[(1-imminoetil)ammino]-5-eptenoico, 2-[[[(1R,3S)-3-ammino-4-idrossi-1-(5-tiazolil)-butil]tio]-5-cloro-3-piridincarbonitrile]; 2-[[[(1R,3S)-3-ammino-4-idrossi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-4-clorobenzonitrile, (2S,4R)-2-ammino-4-[[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]tio]-5-tiazolbutanolo, 2-[[[(1R,3S)-3-ammino-4-idrossi-1-(5-tiazolil)-butil]tio]-6-(trifluorometil)-3 piridincarbonitrile, 2-[[[(1R,3S)-3-ammino-4-idrossi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-5-clorobenzonitrile, N-[4-[2-(3-clorobenzilammino)etil]fenil]tiofen-2-carbossamidina, o guanidinoetildisolfuro;
- un inibitore dell'acetilcolinesterasi quale donepezil;
- un antagonista della prostaglandina E₂ sottotipo 4 (EP4) quale N-[(2-[4-(2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)fenil]etil)ammino)-carbonil]-4-metilbenzensolfonammide o acido 4-[(1S)-1-({[5-cloro-2-(3-fluorofenossi)piridin-3-il]carbonil}ammino)etil]benzoico;
- un antagonista del leucotriene B₄; quali acido 1-(3-bifenil-4-ilmetil-4-idrossi-croman-7-il)-ciclopentancarbossilico (CP-105696), acido 5-[2-(2-carbossietil)-3-[6-(4-metossifenil)-5E-esenil]ossifenossi]-valerico (ONO-4057) o DPC-11870,
- un inibitore della 5-lipossigenasi, quale zileuton, 6-[(3-fluoro-5-[4-metossi-3,4,5,6-tetraidro-2H-piran-4-il])fenossi-metil]-1-metil-2-chinolone (ZD-2138), o 2,3,5-trimetil-6-(3-piridilmetil),1,4-benzochinone (CV-6504);
- un bloccante il canale del sodio, quale lidocaina; o
- un antagonista di 5-HT₃, quale ondansetron;

e suoi sali e solvati farmaceuticamente accettabili.

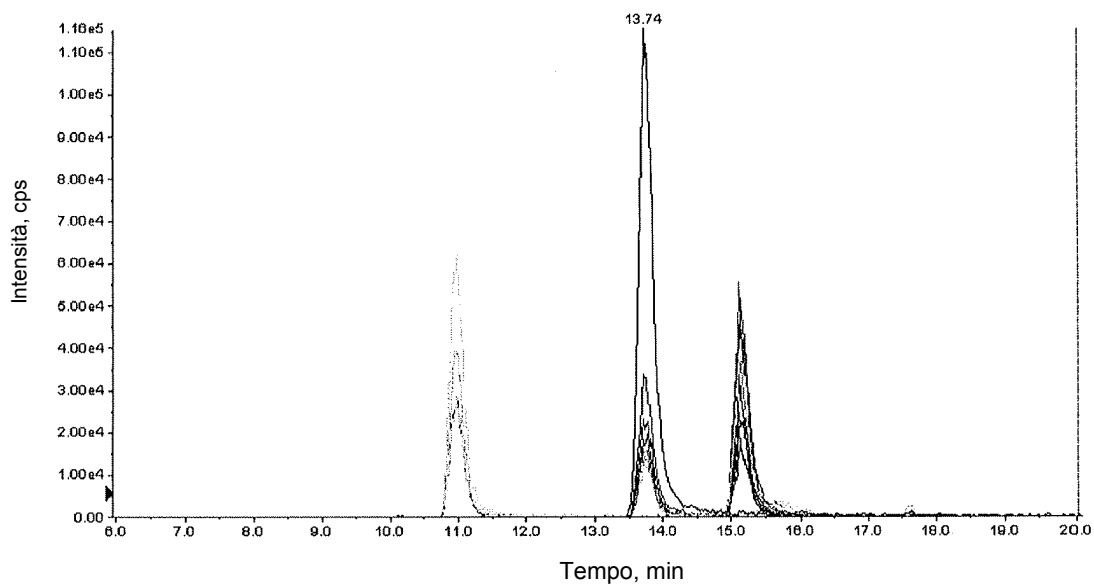
15. Composizione farmaceutica, comprendente p75NTR(NBP) secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, e un veicolante e/o un eccipiente farmaceuticamente accettabile per l'uso in una qualsiasi o più tra prevenzione, miglioramento, controllo, riduzione dell'incidenza di, o ritardo dello sviluppo o della progressione del dolore.

Figura 1 - sequenza del dominio extracellulare di p75NTR, domini leganti la neurotrofina evidenziati in grassetto

1 MGAGATGRAM DGPRIIIIIII LGVSLGGAKE ACPTGLYTHS GECCKACNLG
51 EGVAQPCGAN QTVCEPCLDS VTFSDVVSAT EPCKPCTECV GLQSMSAPCV
101 EADDAVCRCA **YGYQDETTG RCEACRVCEA GSGLVFSCQD KQNTVCEECF**
151 **DGTYSDEANH VDPCLPCTVC EDTERQLREC TRWADAECEE IPGRWITRST**
201 PPEGSdstap STQEPEAPPE QDLIASTVAG VVTTVMGSSQ PVVTRGTTDN
251 LIPVYCSILA AVVVGLVAYI AFKRWNSCKQ NKQGANSRPV NQTPPPEGEK
301 LHSDSGISVD SSQLHDQQPH TQTASGQALK GDGGLYSSLP PAKREEVEKL
351 LINGSAGDWR HLAGELGYQP EHIDSFTEHA CPVRALLASW ATQDSATLDA
401 LLAALRRIQR ADLVESLCSE STATSPV

Figura 2 - Peptidi identificati mediante LCMS/Ms di una chimera p75NTR-Fc, prodotto digerito standard

[a] rivelazione del dominio extracellulare di p75NTR standard



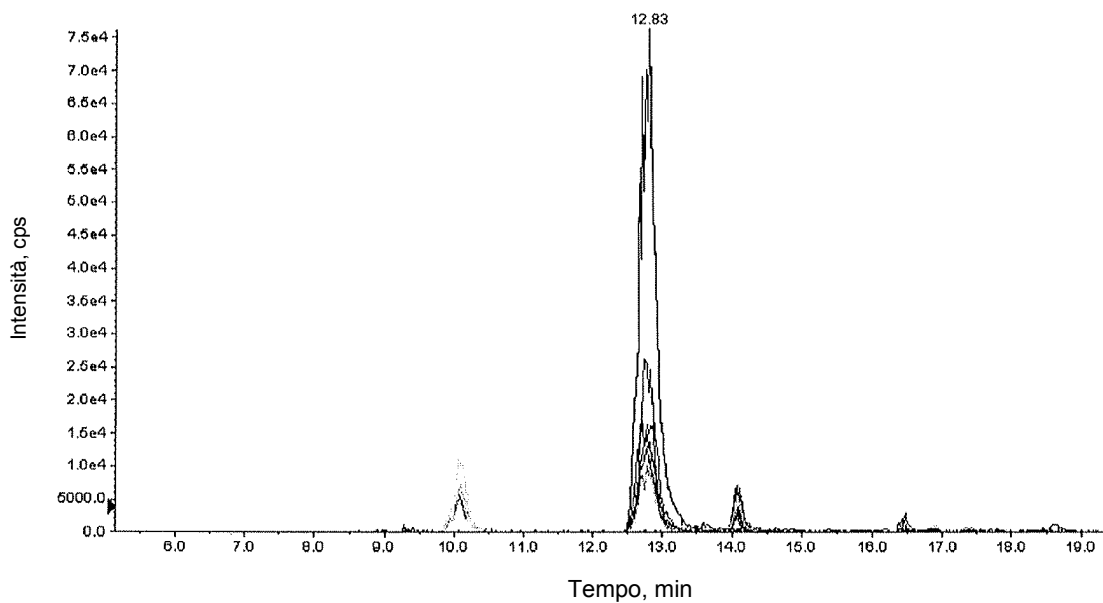
Picco a 11,0 min = CAYGYQDETTGR

Picco a 13,74 min = WDAECEEIPGR

Picco a 15,2 min = VCEAGSGLVFSCQDK

Figura 2 [b] - Peptidi identificati mediante LCMS/Ms di una chimera p75NTR-Fc, prodotto digerito standard

[b] rivelazione del dominio extracellulare p75 del saggio NGF totale usando siero umano commerciale

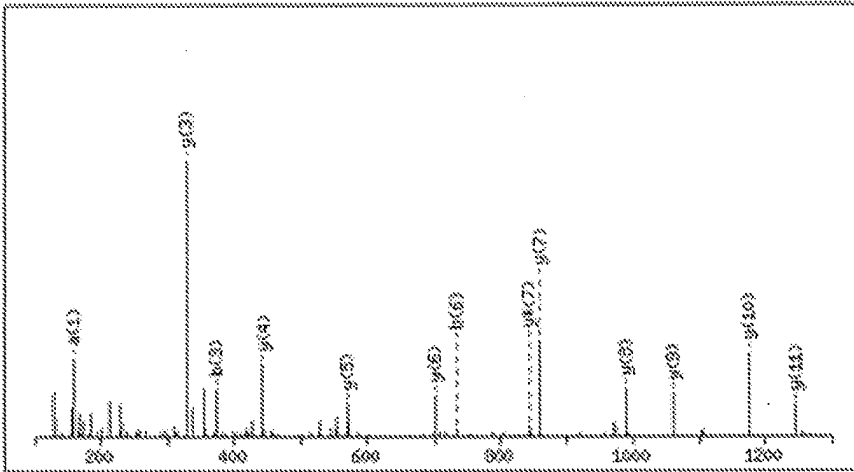


Picco a 10,0 min = CAYGYYQDETTGR

Picco a 12,83 min = WADAECEEIPGR

Picco a 14,2 min = VCEAGSGLVFSCQDK

Figura 3. Conferma della sequenza mediante MS/MS del picco WADAECEEIPGRA mostrato in figura 2



Massa monoisotopica del peptide neutro Mr(calc): 1431,61

Modificazioni fissate: carbammidometile (C)

Punteggio ionico: 94 previsto: 6,4e-007

Appaiamenti (rosso in grassetto) 13/88 ioni frammento usando 14 picchi più intensi

#	a	a ⁺⁺	b	b ⁺⁺	Seq	y	y ⁺⁺	y ⁺	y ⁺⁺⁺	#
1	189.09	80.05	187.09	94.05	W					12
2	230.13	115.37	258.13	129.57	A	1246.54	623.77	1229.51	615.26	11
3	345.16	173.08	373.15	187.08	D	1175.50	588.25	1158.47	579.74	10
4	416.19	208.60	444.19	222.60	A	1060.47	530.74	1043.45	522.23	9
5	545.24	273.12	573.23	287.12	E	989.44	495.22	972.41	486.71	8
6	705.27	353.14	733.26	367.13	C	880.39	430.76	843.37	422.19	7
7	834.31	417.66	862.30	431.66	E	700.36	350.68	683.34	342.17	6
8	963.35	482.18	991.35	496.18	E	571.32	286.16	554.29	277.65	5
9	1076.44	538.72	1104.43	552.72	I	442.28	221.64	425.25	213.13	4
10	1173.49	587.25	1201.48	601.25	P	329.19	165.10	312.17	156.59	3
11	1230.51	615.76	1258.50	629.76	G	232.14	116.57	215.11	108.06	2
12					R	175.12	88.06	158.09	79.55	1

Figura 4. - p75NTR(NBP) inibisce la funzione di NGF nella linea cellulare U20S che esprime TrkA e nella linea cellulare U20S che co-esprime TrkA e p75NTR

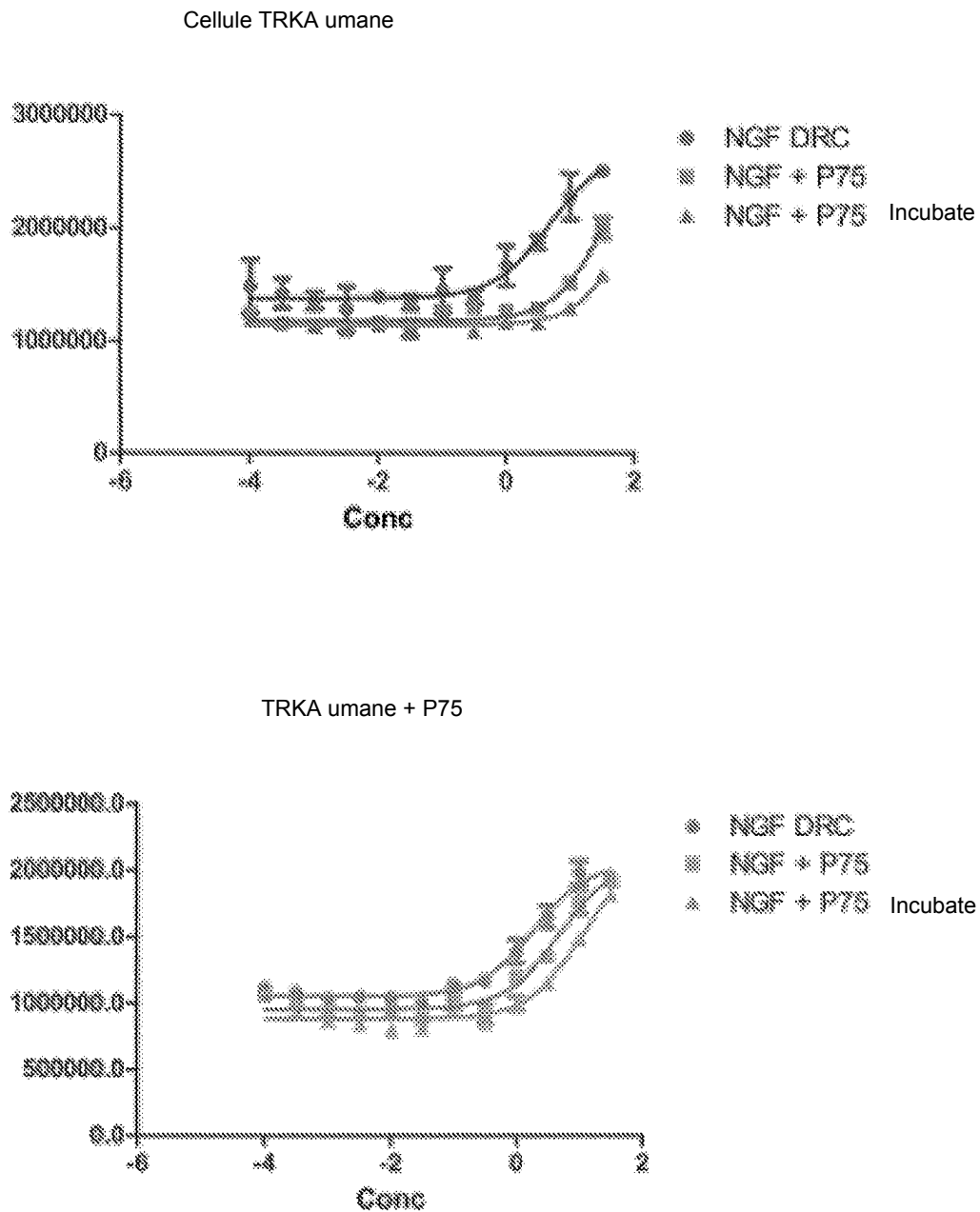


Figura 5 - p75NTR(NBP) solubile inibisce la funzione di BDNF nella linea cellulare U20S che esprime TrkA e nella linea cellulare U20S che co-esprime TrkA e p75NTR

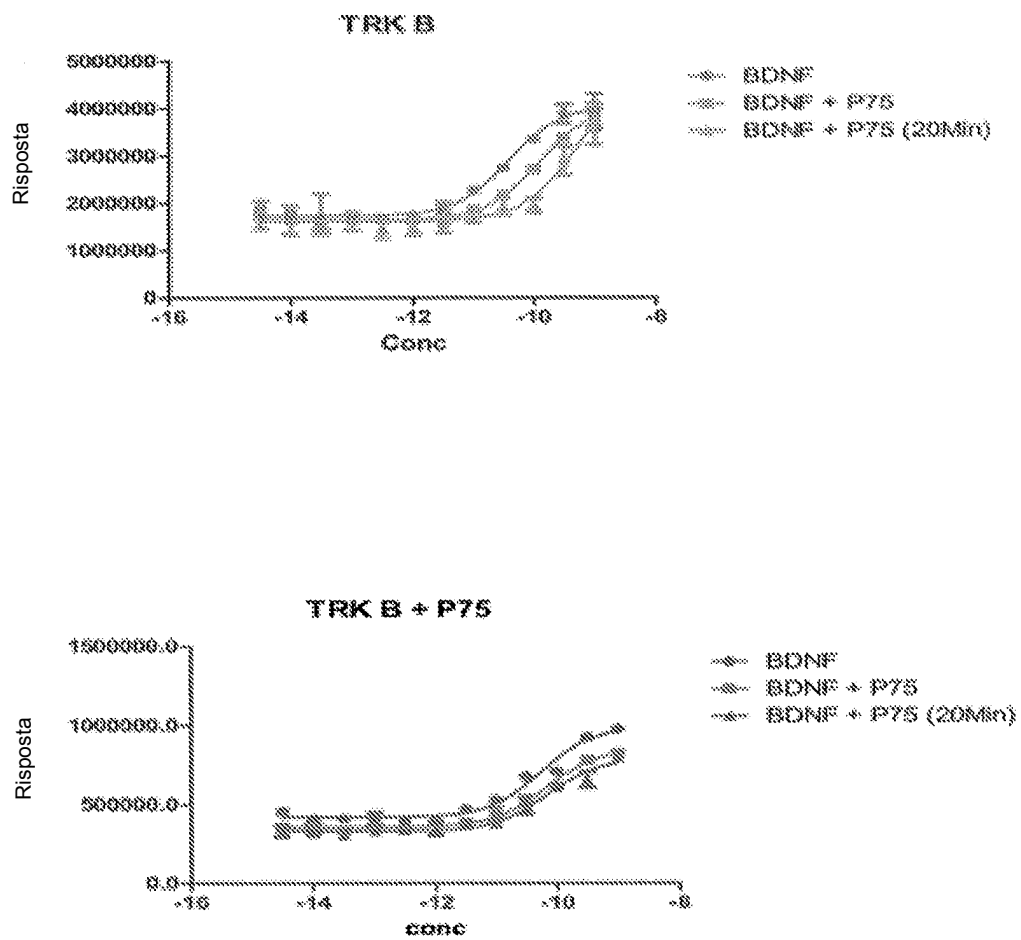


Figura 6 Dati Biocore che dimostrano il legame di p75NTR(NBP) a BDNF e la competizione tra anti-BDNF e p75NTR(NBP)

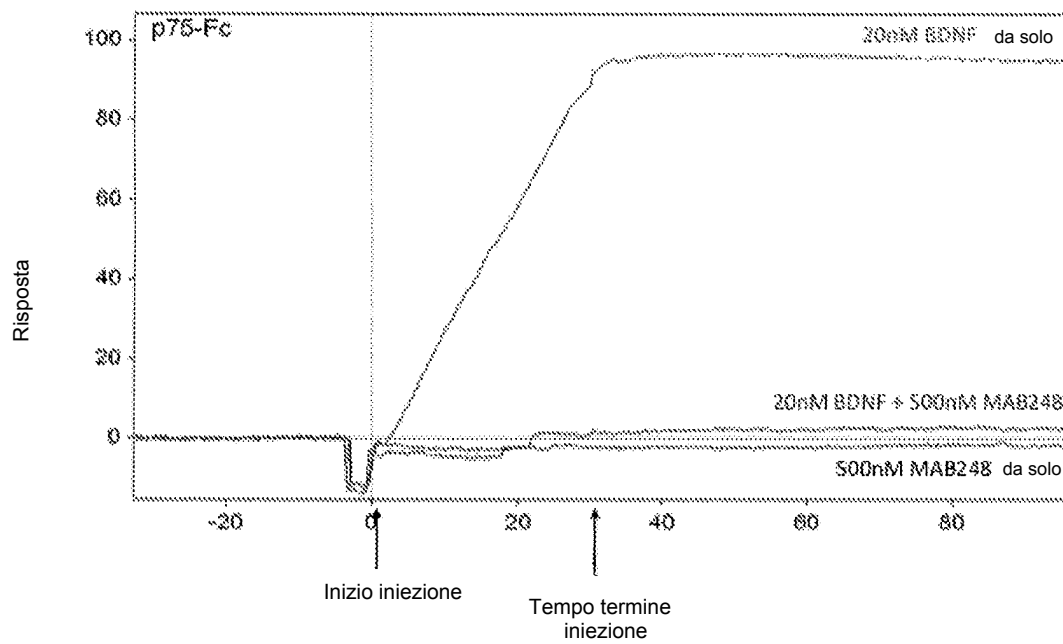


Figura 7 - inibizione dell'attività NGF mediante p75NTR(NBP) in cellule PC12

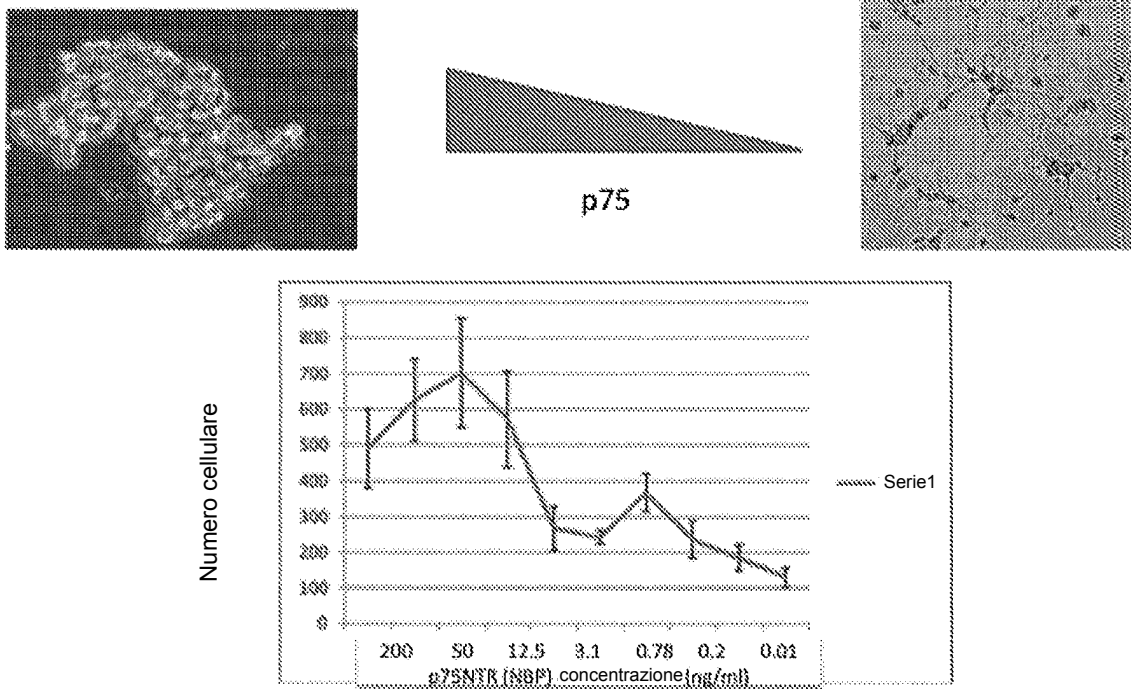
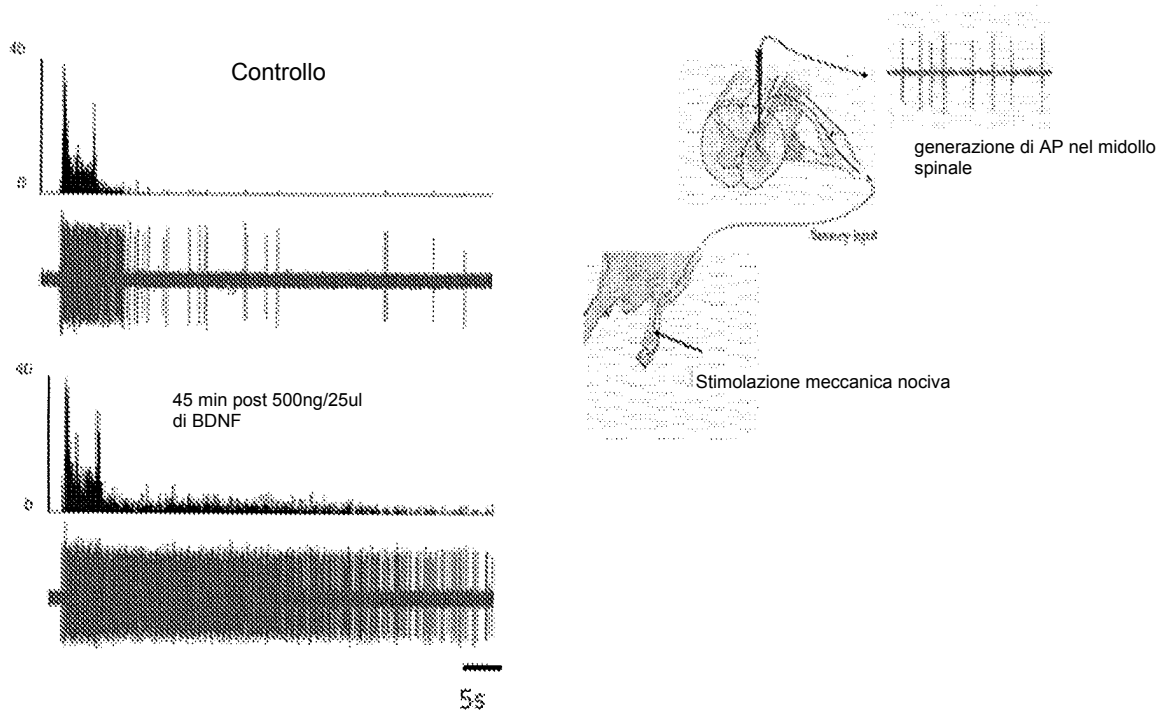


Figura 8 - p75NTR(NBP) inibisce l'effetto del dolore da BDNF in un modello di eccitabilità nervosa



Basale

Pizzicotto

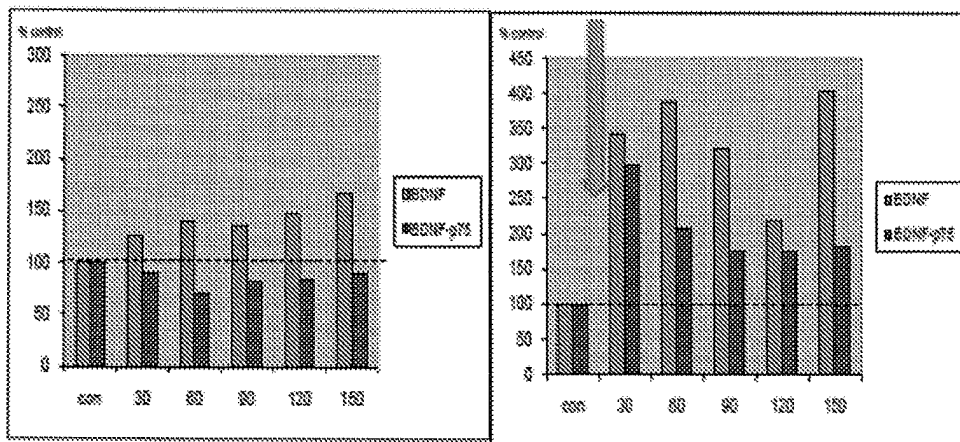


Figura 9 - la proteina legante la neurotrofina p75NTR(NBP) inibisce l'iperalgia in un modello UVIH

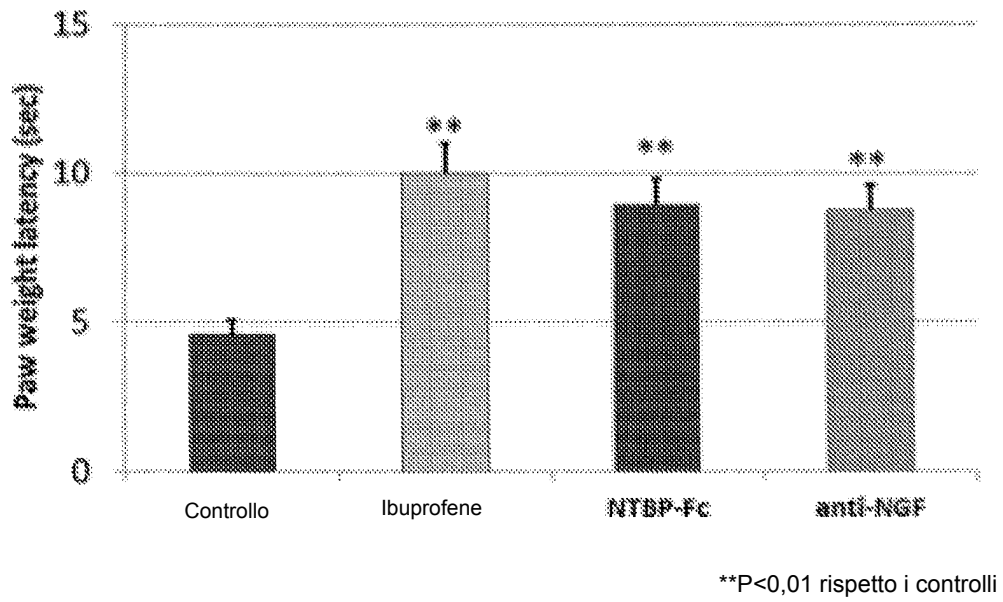


Figura 10 - SEQ ID NO. 1 sequenza amminoacidica completa di p75NTR umana

```

1  mgagatgram dgprlllllll lgvslggake acptglyths gecckacnlg egvaqpcgan
61  qtvcepclds vtfsdvvsat epckpctecv glqmsapcv eaddavcrca ygyyqdettg
121 rceacrvicea gsglvfscqd kqntvceecp dgtysdeanh vdpclpctvc edterqlrec
181 trwadaecee ipgrwitrst ppegsdstap stqepeappe qdliastvag vttvmgssq
241 pvvtrgtdn lipvycsila avvvglvayi afkrwnsckq nkqgansrpv nqtppegeq
301 lhsdsgisvd sqslhdqqph tqtasgqalk gdglysslp pakreevekl lngsagdtwr
361 hlagelgyqp ehidsfthea cpvrallasw atqdsatlda llaalrriqr adlveslce
421 statspv

```

Figura 11 - SEQ ID NO. 2 dominio extracellulare di p75NTR umana che include la sequenza segnale

```

1  mgagatgram dgprlllllll lgvslggake acptglyths gecckacnlg egvaqpcgan
61  qtvcepclds vtfsdvvsat epckpctecv glqmsapcv eaddavcrca ygyyqdettg
121 rceacrvicea gsglvfscqd kqntvceecp dgtysdeanh vdpclpctvc edterqlrec
181 trwadaecee ipgrwitrst ppegsdstap stqepeappe qdliastvag vttvmgssq
241 pvvtrgtdn

```

Figura 12 - SEQ ID NO. 2 dominio extracellulare di p75NTR umana che include la sequenza segnale

```

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

```

Figura 13 - SEQ ID NO. 4 dominio 1 legante la neurotrofina p75NTR(NBP) umana
CAYGYQDETTGRFigura 14 - SEQ ID NO. 5 dominio 2 legante la neurotrofina p75NTR(NBP) umana
VCEAGSGLVFSCQD KQNTVCEECP GGTYSDEANH VDPCLPCTVCEDTERFigura 15 - SEQ ID NO.6 dominio 3 legante la neurotrofina p75NTR(NBP) umana
VCEAGSGLVFSCQDKFigura 16 - SEQ ID NO. 7 dominio 4 legante la neurotrofina p75NTR(NBP) umana
WADAECEEIPGRFigura 17 - SEQ ID NO. 8 dominio 5 legante la neurotrofina p75NTR(NBP) umana
LDSVTSDVVSATEPCKP

Figura 18 - SEQ ID NO. 9 Transferrina umana

```

1  mrlavgallv cavlgcllav pdktvrwacv seheatkcqs frdhmksvip sdgpsvacvk
61  kasyldcira iaaneadavt ldaglvday lapnnlkpvv aefygskedp qtfyyavavv
121 kkdsgfqmnq lrgkkschtg lgrsagwnip igllycdlpe prkplekava nffsgscapc
181 adgtdfpqlc qlcpqcgst lnqyfgysga fkclkdagd vafvkhstif enlankadr
241 qyellclndt rkpvdeykdc hlaqvpshtv varsmgged liwellnqaq ehfgkdkcke
301 fqlfssphgk dllfkdsahg flkvpprmda kmylgyeyvt airnregtc peaptdeckp
361 vkwcalshhe rlkcdewsvn svgkiecvsa ettedciaki mngeadamsl dggfvyiagk
421 cglvpvlaen ynksdncedt peagyfavav vkksasdlw dnlkgkksch tavgrtagwn
481 ipmgllynki nhcrfdeffs egcapgskkd sslcklcmgs glnlcepnk egyptgaf
541 rclvekgdva fvkhtvpqn tggknpdpwa knlnekdyel lclgdtrkp eeyanchlar
601 apnhavtrk dkeacvhkil rqqhlfgsn vtdcsgnfl frsetkdllf rddtvclakl
661 hdnryeykyl geeyvkavgn lrcstssll eactfrp

```

Figura 19 - SEQ ID NO. 10 albumina umana

```

1 mkwvtfisl1 flfssaysrg vfrrdahkse vahrfkdlge enfkalvlia faqylqqcpf
61 edhvklvnev tefaktcvad esaencdksl htlfgdklct vatlretyge madccakqep
121 ernecflqhk ddnplprlv rpevdvmcta fhdneetflk kylyeiarrh pyfyapellf
181 fakrykaaft eccqaadkaa cllpkldelr degkassakq rlkcaslqkf gerafkawav
241 arlsqrfpka efaevsklvt dltkvhtecc hgdllecadd radlakyice nqdsissklk
301 eccepllek shciaevend empadlpsla adfveskdvc knyaeakdvf lgmflyeyar
361 rhpdyvsvll lrlaktyett lekccaaadp hecyakvfde fkplveepqn likqncelfe
421 qlgeykfqna llvrytkkvp qvstptlvev srnlgkvqsk cckhpeakrm pcaedylsvv
481 lnqlcvlhek tpsvdrvtkc cteslvnrp cfsalevdet yvpkefnaet ftfhadictl
541 sekerqikkq talvelvkhk pkatkeqlka vmddfaafve kckkaddket cfaeegkklv
601 aasqaalgl

```

Figura 20 - SEQ ID NO. 11 Fc IgG1 umana

```

1 ggpsvflfpp kpkdtlmisr tpevtcvvvd vshedpevkf nwyvdgvevh naktkpreeq
61 ydstyrvvsv ltvlhqdwln gkeykckvsn kalpapiekt iskakgqpre pqvytlpps r
121 eemtknqvsl tclvkgfyys diavewesng qpennykttp pvldsdgsff lyskltvdks
181 rwqqgnvfsc svmhealnhh ytqkslsislsp gk

```

Figura 21 - SEQ ID NO. 12 Fc IgG2 umana

```

1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsgaltsgv htfpavlqss
61 glyslssvvt vtssnfgtqt ytcnvdhkps ntkvdkter kccvecppcp appvagpsvf
121 lfppkpkdtl misrtpevtc vvvdvshedp evqfnwyvdg mevhnaktkp reeqfnstfr
181 vsvlvtvvhq dwlngkeykc kvsnkglpap iektisktkg qprepvytl ppsreemtkn
241 qvsltclvkg fypsdiavew esngqpenny kttppmlsd gsfflysklt vdksrwqqgn
301 vfcscvmhea lnhhytqksl slspgk

```

Figura 22 - SEQ ID NO. 13 Fc IgG3 umana

```

1 cytlllllttp swvlsqvtlk esgpvlvkpt etliltctvs gfslnakmg vswirqppgk
61 alewlahifs ndeksystsl ksrltiskdt sksqvltmt nmdpvdttaty ycariftity
121 snyvlyyyyy mdvwgkgttv tvssastkqp svfplapcsr stsgg

```

Figura 23 - SEQ ID NO. 14 Fc IgG4 umana

```

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

```

Figura 24 - SEQ ID NO. 15 Frammento Fc umano ingegnerizzato per l'emivita sierica prolungata

```

1 ggpsvflfpp kpkdtlyitr epevtcvvvd vshedpevkf nwyvdgvevh naktkpreeq
61 ynstyrvvsv ltvlhqdwln gkeykckvsn kalpapiekt iskakgqpre pqvytlpps r
121 deltknqvsl tclvkgfyys diavewesng qpennykttp pvldsdgsff lyskltvdks
181 rwqqgnvfsc svmhealnhh ytqkslsislsp

```

Figura 25 - SEQ ID NO. 16 Frammento Fc umano ingegnerizzato per la perdita di funzioni effettrici

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

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

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

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

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

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

GGGGS