

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2003.12.24	(73) Titular(es): RINAT NEUROSCIENCE CORP. 230 EAST GRAND AVENUE SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080 US
(30) Prioridade(s): 2002.12.24 US 436905 P 2003.01.28 US 443522 P 2003.10.08 US 510006 P	(72) Inventor(es): DAVID L. SHELTON US JAUME PONS US ARNON ROSENTHAL US
(43) Data de publicação do pedido: 2005.09.21	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2012.04.11 102/2012	

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-NGF E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A ANTICORPOS ANTI-NGF (TAIS COMO ANTICORPOS ANTAGONISTAS ANTI-NGF) E A POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAM OS MESMOS. A INVENÇÃO REFERE-SE AINDA À UTILIZAÇÃO DESSES ANTICORPOS E/OU POLINUCLEÓTIDOS NO TRATAMENTO E/OU NA PREVENÇÃO DA DOR, INCLUINDO DOR PÓSCIRÚRGICA, DOR DE ARTRITE REUMATOIDE E DOR DE OSTEOARTRITE.

RESUMO**"ANTICORPOS ANTI-NGF E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS"**

A invenção refere-se a anticorpos anti-NGF (tais como anticorpos antagonistas anti-NGF) e a polinucleótidos que codificam os mesmos. A invenção refere-se ainda à utilização desses anticorpos e/ou polinucleótidos no tratamento e/ou na prevenção da dor, incluindo dor pós-cirúrgica, dor de artrite reumatoide e dor de osteoartrite.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS ANTI-NGF E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS"

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a anticorpos anti-NGF (tais como anticorpos antagonistas anti-NGF). A invenção refere-se ainda à utilização desses anticorpos no tratamento e/ou na prevenção da dor, incluindo dor pós-cirúrgica, dor de artrite reumatoide e dor de osteoartrite.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O fator de crescimento do nervo (NGF) foi a primeira neurotrofina a ser identificada, e a sua função no desenvolvimento e na sobrevivência dos neurónios centrais e periféricos foi bem caracterizada. O NGF mostrou ser um fator de manutenção e sobrevivência crítico no desenvolvimento de neurónios sensoriais embrionários e simpáticos periféricos, bem como de neurónios colinérgicos do cérebro anterior basal. Smeyne et al., *Nature* 368:246-249 (1994) e Crowley et al., *Cell* 76:1001-1011 (1994). O NGF aumenta a expressão de neuropeptídeos nos neurónios sensoriais (Lindsay and Harmer, *Nature* 337:362-364 (1989)) e a respetiva atividade é mediada através de dois recetores diferentes ligados por membrana, o recetor TrkA e o recetor de neurotrofinas comum p75 (por vezes denominados recetores NGF de "alta afinidade" e de "baixa afinidade", respetivamente). Chao et al., *Science* 232:518-521 (1986). Para obter uma recapitulação sobre o NGF, consulte Huang et al., *Annu. Rev. Neurosci.* 24:677-736 (2001); Bibel et al., *Genes Dev.* 14:2919-2937 (2000). A estrutura cristalina de NGF e NGF no complexo com o recetor trkA foi determinada. Consulte *Nature* 254:411 (1991); *Nature* 401:184-188 (1996).

O fator de crescimento do nervo (NGF) foi a primeira neurotrofina a ser identificada, e a respetiva função no desenvolvimento e na sobrevivência dos neurónios centrais e

periféricos foi bem caracterizada. O NGF mostrou ser um fator de manutenção e sobrevivência crítico no desenvolvimento de neurónios sensoriais embrionários e simpáticos periféricos, bem como de neurónios colinérgicos do cérebro anterior basal (Smeyne, et al., *Nature* 368:246-249 (1994) e Crowley, et al., *Cell* 76:1001-1011 (1994)). O NGF aumenta a expressão de neuropéptidos nos neurónios sensoriais (Lindsay, et al., *Nature* 337:362-364 (1989)), e a respetiva atividade é mediada através de dois recetores diferentes ligados por membrana, o recetor tirosina quinase TrkA e o recetor p75, que está relacionado estruturalmente com outros membros da família de recetores do fator de necrose tumoral (Chao, et al., *Science* 232:518-521 (1986)).

Além destes efeitos no sistema nervoso, o NGF tem sido cada vez mais utilizado em processos fora do sistema nervoso. Por exemplo, o NGF mostrou melhorar a permeabilidade vascular (Otten, et al., *Eur J Pharmacol.* 106:199-201 (1984)), melhorar as respostas imunitárias da célula T e B (Otten, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 86:10059-10063 (1989)), induzir diferenciação de linfócitos e proliferação de mastócitos e causar a libertação de sinais biológicos solúveis a partir de mastócitos (Matsuda, et al., *Proc. Natl. Acad Sci. EUA* 85:6508-6512 (1988); Pearce, et al., *J. Physiol.* 372:379-393 (1986); Bischoff, et al., *Blood* 79:2662-2669 (1992); Horigome, et al., *J. Biol. Chem.* 268:14881-14887 (1993)). Embora o NGF adicionado de forma exógena tenha mostrado ser capaz de ter todos estes efeitos, é importante referir que só raras vezes foi mostrado que o NGF endógeno é importante em qualquer um destes processos *in vivo* (Torcia, et al., *Cell.* 85(3): 345-56 (1996)). Por conseguinte, não é claro qual poderá ser o efeito, se existir algum, da inibição da bioatividade de NGF endógeno.

O NGF é produzido por diversos tipos de célula, incluindo mastócitos (Leon, et al., *Proc. Natl. Acad Sci.*

EUA 91: 3739-3743 (1994)), linfócitos B (Torcia, et al., *Cell* 85:345-356 (1996), queratinócitos (Di Marco, et al., *J. Biol. Chem.* 268:22838-22846)), células do músculo liso (Ueyama, et al., *J. Hypertens.* 11:1061-1065 (1993)), fibroblastos (Lindholm, et al., *Eur. J. Neurosci.* 2:795-801 (1990)), células epiteliais brônquicas (Kassel, et al., *Clin, Exp. Allergy* 31:1432-40 (2001)), células mesangiais renais (Steiner, et al., *Am. J. Physiol.* 261:F792-798 (1991)) e miotubos do músculo-esquelético (Schwartz, et al., *J Photochem. Photobiol.* B66:195-200 (2002)). Os recetores NGF foram descobertos numa variedade de tipos de célula fora do sistema nervoso. Por exemplo, TrkA foi descoberto em monócitos humanos, linfócitos T e B e mastócitos.

Foi observada uma associação entre níveis de NGF maiores e uma variedade de condições inflamatórias nos pacientes humanos, bem como em diversos modelos animais. Estas incluem lúpus eritematoso sistémico (Bracci-Laudiero, et al., *Neuroreport* 4:563-565 (1993)), esclerose múltipla (Bracci-Laudiero, et al., *Neurosci. Lett.* 147:9-12 (1992)), psoríase (Raychaudhuri, et al., *Acta Derm. l'enereol.* 78:84-86 (1998)), artrite (Falcim, et al., *Ann. Rheum. Dis.* 55:745-748 (1996)), cistite intersticial (Okragly, et al., *J. Urology* 161:438-441 (1999)) e asma (Braun, et al., *Eur. J Immunol.* 28:3240-3251 (1998)).

Constantemente, um nível elevado de NGF nos tecidos periféricos é associado a hiperalgesia e inflamação, e tal foi observado em diversas formas de artrite. A membrana sinovial dos pacientes afetados por artrite reumatoide expressa níveis elevados de NGF, enquanto na membrana sinovial não inflamada, o NGF foi declarado como não sendo detetável (Aloe, et al., *Arch. Rheum.* 35:351-355 (1992)). Foram observados resultados semelhantes em ratos com artrite reumatoide induzida experimentalmente (Aloe, et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:203-204 (1992)). Foram

declarados níveis elevados de NGF em ratinhos artríticos transgênicos juntamente com um aumento no número de mastócitos (Aloe, et al., *Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects* 15: 139-143 (1993)). A Publicação PCT n.º WO 02/096458 divulga a utilização de anticorpos anti-NGF de determinadas propriedades no tratamento de vários distúrbios relacionados com NGF, tal como uma condição inflamatória (por ex. artrite reumatoide). Foi declarado que um anticorpo anti-NGF purificado injetado nos ratinhos transgênicos artríticos transportando o gene do fator- α de necrose tumoral (TNF- α) humano provocou uma redução no número de mastócitos, bem como uma diminuição nos níveis de histamina e substância P na membrana sinovial dos ratinhos com artrite (Aloe et al., *Rheumatol. Int.* 14: 249-252 (1995)). Foi demonstrado que a administração exógena de um anticorpo NGF reduziu o nível melhorado de TNF- α que ocorre nos ratinhos artríticos (Manni et al., *Rheumatol. Int.* 18: 97-102 (1998)).

Igualmente, a maior expressão de NGF e recetor NGF de alta afinidade (TrkA) foi observada nos condrócitos da osteoartrite humana (Iannone et al., *Rheumatology* 41:1413-1418 (2002)).

Foram declarados anticorpos antagonistas anti-NGF de roedor. Consulte, por ex., Hongo et al, *Hybridoma* (2000) 19(3): 215-227; Ruberti et Al. (1993) *Cell. Molec. Neurobiol.* 13(5): 559-568. Contudo, quando os anticorpos de roedor são utilizados terapêuticamente em seres humanos, é desenvolvida uma resposta de anticorpo antimurino humano num número significativo de indivíduos tratados. Além disso, as funções efetoras dos anticorpos de ratinho provaram ser menos eficazes no contexto humano. Deste modo, existe uma séria necessidade de anticorpos antagonistas anti-NGF, incluindo anticorpos antagonistas anti-NGF humanizados.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção aqui divulgada refere-se a anticorpos para o fator de crescimento do nervo.

Num aspeto, a invenção fornece um anticorpo antifator de crescimento do nervo (NGF) ou fragmento do mesmo, que compreende:

(a) três CDRs de uma região variável de cadeia pesada de SEQ. ID N.º 1; e

(b) três CDRs de uma região variável de cadeia leve de SEQ. ID N.º 2;

em que as CDRs são CDRs de Kabat, CDRs de Chothia, ou uma combinação de CDRs de Kabat e Chothia, e em que o anticorpo ou fragmento do mesmo liga o NGF humano com uma K_D de 2 nM ou menos, conforme determinado pela ressonância de plasma de superfície BIAcore.

Noutro aspeto, a invenção fornece um anticorpo antifator de crescimento do nervo (NGF) ou fragmento do mesmo, que compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende:

(i) uma região CDR1 de SEQ. ID N.º 3;

(ii) uma região CDR2 de SEQ. ID N.º 4;

(iii) uma região CDR3 selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ. ID N.ºs 58 e 60; e

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende:

(i) uma região CDR1 de SEQ. ID N.º 6;

(ii) uma região CDR2 de SEQ. ID N.º 7;

(iii) uma região CDR3 selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ. ID N.ºs 57, 59 e 61;

em que o anticorpo ou fragmento do mesmo liga o NGF humano com uma K_D de 2nM ou menos conforme determinado pela ressonância de plasma de superfície BIAcore.

Noutro aspeto, a invenção corresponde a um anticorpo humanizado e de afinidade maturada, E3, que liga

especificamente o fator de crescimento do nervo ("NGF") humano e de roedor. As sequências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve de E3 são ilustradas nas Figuras 1A (SEQ. ID N.º 1) e 1B (SEQ. ID N.º 2), respectivamente. As porções de CDR do anticorpo E3 (incluindo CDRs de Chothia e de Kabat) são representadas esquematicamente nas Figuras 1A e 1B. As sequências de aminoácidos de cadeias pesadas e leves de E3 e das CDRs alargadas individuais são ilustradas igualmente abaixo (Consulte "sequências de anticorpos" abaixo).

Noutro aspeto, a invenção corresponde a um anticorpo que compreende um fragmento ou uma região do anticorpo E3 (aqui alternadamente denominado "E3"). Numa forma de realização, o fragmento é uma cadeia leve do anticorpo E3, conforme ilustrado na Figura 1B. Noutra forma de realização, o fragmento é uma cadeia pesada do anticorpo E3, conforme ilustrado na Figura 1A. Ainda noutra forma de realização, o fragmento contém uma ou mais regiões variáveis de uma cadeia leve e/ou de uma cadeia pesada do anticorpo E3. Ainda noutra forma de realização, o fragmento contém uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de uma cadeia leve e/ou de uma cadeia pesada do anticorpo E3, conforme ilustrado nas Figuras 1A e 1B.

Noutro aspeto, a invenção corresponde a um anticorpo que compreende uma cadeia leve que é codificada por um polinucleótido produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4893 ou ATCC N.º PTA-4894. Noutro aspeto, a invenção corresponde a um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleótido produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895. Noutro aspeto, a invenção corresponde a um anticorpo que compreende (a) uma cadeia leve que é codificada por um polinucleótido produzido por uma célula hospedeira com um número de

depósito de ATCC N.º PTA-4894 ou ATCC N.º PTA-4893; e (b) uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleótido produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895 (por uma questão de conveniência, os polinucleótidos produzidos por uma célula hospedeira depositada são aqui referidos como tendo um número de depósito de ATCC N.ºs PTA-4894, PTA-4893 e PTA-4895). Noutro aspeto, a invenção corresponde a um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia leve de uma cadeia leve que é codificada por um polinucleótido produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4894 ou ATCC N.º PTA-4893. Noutro aspeto, a invenção corresponde a um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada de uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleótido produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895. Noutro aspeto, a invenção corresponde a um anticorpo que compreende (a) uma região variável de cadeia leve de uma cadeia leve que é codificada por um polinucleótido produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4894 ou ATCC N.º PTA-4893, e (b) uma região variável de cadeia pesada de uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleótido produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895. Noutro aspeto ainda, a invenção corresponde a um anticorpo que compreende uma ou mais CDRs codificadas por (a) um polinucleótido produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4894; e/ou (b) uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleótido produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895.

Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende a região constante de cadeia pesada IgG2a humana. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende a região constante de cadeia leve kappa humana.

Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma região constante modificada, tal como uma região constante que é imunologicamente inerte, por ex. não aciona a lise mediada pelo complemento ou não estimula a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC). Noutras formas de realização, a região constante é modificada conforme descrito em *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624; Pedido de Patente PCT/GB99/01441; e/ou Pedido de Patente UK 9809951.8. Noutras formas de realização ainda, o anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada IgG2a humana que compreende as seguintes mutações: A330P331 a S330S331 (numeração de aminoácidos relativamente à sequência de IgG2a de tipo selvagem). *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624.

Noutro aspeto, a invenção fornece polipéptidos (que podem ou não ser um anticorpo) que compreendem qualquer um ou mais dos seguintes: a) uma ou mais CDRs do anticorpo E3 ilustradas nas Figuras 1A e 1B; b) CDR H3 da cadeia pesada do anticorpo E3 ilustrada na Figura 1A; c) CDR L3 da cadeia leve do anticorpo E3 ilustrada na Figura 1B; d) três CDRs da cadeia leve do anticorpo E3 ilustradas na Figura 1B; e) três CDRs da cadeia pesada do anticorpo E3 ilustradas na Figura 1A; e f) três CDRs da cadeia leve e três CDRs da cadeia pesada do anticorpo E3 ilustradas nas Figuras 1A e 1B. A invenção fornece ainda polipéptidos (que podem ou não ser um anticorpo) que compreendem qualquer um ou mais dos seguintes: a) uma ou mais (uma, duas, três, quatro, cinco ou seis) CDRs derivadas do anticorpo E3 ilustradas nas Figuras 1A e 1B; b) uma CDR derivada de CDR H3 da cadeia pesada do anticorpo E3 ilustrada na Figura 1A; e/ou c) uma CDR derivada de CDR L3 da cadeia leve do anticorpo E3 ilustrada na Figura 1B. Em algumas formas de realização, as CDRs podem ser CDRs de Kabat, CDRs de Chothia, ou uma combinação de CDRs de Kabat e Chothia (aqui denominadas CDRs "alargadas" ou "combinadas"). Em algumas formas de

realização, os polipéptidos (tal como um anticorpo) ligam o NGF (tal como o NGF humano). Em algumas formas de realização, os polipéptidos compreendem qualquer uma das configurações de CDR (incluindo combinações, variantes, etc.) aqui descritas.

Além disso, são descritos polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ. ID N.º 9, em que 134 corresponde a S, L, V, A ou I; e N35 é substituído por N, T ou S. Por uma questão de conveniência, "substituído" ou "corresponde" neste contexto ou referência a um aminoácido refere-se aqui a escolhas de aminoácidos para uma determinada posição. Como é claro, a substituição, ou escolha, pode ser o aminoácido representado numa SEQ. ID ou Figura.

Além disso, são descritos polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ. ID N.º 10, em que M50 corresponde a M, I, G, Q, S ou L; A62 corresponde a A ou S; e L63 corresponde a L ou V.

Além disso, são descritos polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a D, N ou G; e em que Y110 corresponde a Y, K, S, R ou T.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T;

em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a S, A, C, G, D, N, T ou G; e em que Y110 corresponde a qualquer aminoácido.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ. ID N.º 11, em que G98 corresponde a G, S, A, C, V, N, D ou T; em que G99 corresponde a G, S, A, C, V, N, D ou T; em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a S, A, C, G, D, N, T ou G; e em que Y110 corresponde a qualquer aminoácido.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma região variável de cadeia leve que compreende SEQ. ID N.º 12, em que S26 corresponde a S ou F; D28 corresponde a D, S, A ou Y; e H32 corresponde a H, N ou Q.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma região variável de cadeia leve que compreende SEQ. ID N.º 13, em que I51 corresponde a I, T, V ou A; e S56 corresponde a S ou T.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma região variável de cadeia leve que compreende SEQ. ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a K, H, R ou S; e em que Y96 corresponde a Y ou R.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma região variável de cadeia leve que compreende SEQ. ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a qualquer aminoácido; T93 corresponde a qualquer aminoácido; e em que Y96 corresponde

a Y ou R.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 9, em que 134 corresponde a S, L, V, A ou I; e N35 corresponde a N, T ou S.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 10, em que M50 corresponde a M, I, G, Q, S ou L; A62 corresponde a A ou S; e L63 corresponde a L ou V.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a D, N ou G; e em que Y110 corresponde a Y, K, S, R ou T.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a S, A, C, G, D, N, T ou G; e em que Y110 corresponde a qualquer aminoácido.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 11, em que G98 corresponde a G, S, A, C, V, N, D ou T; em que G99 corresponde a G, S, A, C, V, N, D ou T; em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101

corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a S, A, C, G, D, N, T ou G; e em que Y110 corresponde a qualquer aminoácido.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 12, em que S26 corresponde a S ou F; D28 corresponde a D, S, A ou Y; e H32 corresponde a H, N ou Q.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 13, em que I51 corresponde a I, T, V ou A; e S56 corresponde a S ou T.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a K, H, R ou S; e em que Y96 corresponde a Y ou R.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a qualquer aminoácido; T93 corresponde a qualquer aminoácido; e em que Y96 corresponde a Y ou R.

São descritos igualmente polipéptidos (tais como anticorpos, incluindo anticorpos humanizados) que compreendem uma região variável de cadeia pesada que compreende a região CDR1 de SEQ. ID N.º 9, em que 134 corresponde a S, L, V A ou I; e N35 corresponde a N, T ou S; a região CDR2 de SEQ. ID N.º 10, em que M50 corresponde a M, I, G, Q, S ou L; A62 corresponde a A ou S; e L63 corresponde a L ou V; e a região CDR3 de SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104

corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a D, N ou G; em que Y110 corresponde a Y, K, S, R ou T. Em algumas formas de realização, a região variável de cadeia pesada compreende a região CDR3 de SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a S, A, C, G, D, N, T ou G; em que Y110 corresponde a qualquer aminoácido. Noutras formas de realização, a região variável de cadeia pesada compreende a região CDR3 de SEQ. ID N.º 11, em que G98 corresponde a G, S, A, C, V, N, D ou T; em que G99 corresponde a G, S, A, C, V, N, D ou T; em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a S, A, C, G, D, N, T ou G; e em que Y110 corresponde a qualquer aminoácido. Em algumas formas de realização, o polipéptido (tal como um anticorpo) compreende ainda uma região variável de cadeia leve de anticorpo.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma região variável de cadeia leve que compreende a região CDR1 de SEQ. ID N.º 12, em que S26 corresponde a S ou F; D28 corresponde a D, S, A ou Y; e H32 corresponde a H, N ou Q; a região CDR2 de SEQ. ID N.º 13, em que 151 corresponde a I, T, V ou A; e S56 corresponde a S ou T; e a região CDR3 de SEQ. ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a K, H, R ou

S; e em que Y96 corresponde a Y ou R. Em algumas formas de realização, a região variável de cadeia leve compreende a região CDR3 de SEQ. ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a qualquer aminoácido; T93 corresponde a qualquer aminoácido; e em que Y96 corresponde a Y ou R. Em algumas formas de realização, o polipéptido (tal como um anticorpo) compreende ainda uma cadeia pesada de anticorpo.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem (a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a região CDR1 de SEQ. ID N.º 9, em que 134 corresponde a S, L, V, A ou I; e N35 corresponde a N, T ou S; a região CDR2 de SEQ. ID N.º 10, em que M50 corresponde a M, I, G, Q, S ou L; A62 corresponde a A ou S; e L63 corresponde a L ou V; e a região CDR3 de SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a D, N ou G; em que Y110 corresponde a Y, K, S, R ou T; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a região CDR1 de SEQ. ID N.º 12, em que S26 corresponde a S ou F; D28 corresponde a D, S, A ou Y; e H32 corresponde a H, N ou Q; a região CDR2 de SEQ. ID N.º 13, em que I51 corresponde a I, T, V ou A; e S56 corresponde a S ou T; e a região CDR3 de SEQ. ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a K, H, R ou S; e em que Y96 corresponde a Y ou R. Em algumas formas de realização, a região variável de cadeia leve compreende a região CDR3 de SEQ. ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a qualquer aminoácido; T93 corresponde a qualquer aminoácido; em que Y96 corresponde a Y ou R. Em algumas formas de realização, a região variável

de cadeia pesada compreende a região CDR3 de SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a S, A, C, G, D, N, T ou G; em que Y110 corresponde a qualquer aminoácido. Noutras formas de realização, a região variável de cadeia pesada compreende a região CDR3 de SEQ ID N.º 11, em que G98 corresponde a G, S, A, C, V, N, D ou T; em que G99 corresponde a G, S, A, C, V, N, D ou T; em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a S, A, C, G, D, N, T ou G; e em que Y110 corresponde a qualquer aminoácido. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende ainda uma cadeia leve de anticorpo.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo, incluindo um anticorpo humanizado) que compreendem uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 9, em que I34 corresponde a S, L, V, A ou I; e N35 corresponde a N, T ou S; uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 10, em que M50 corresponde a M, I, G, Q, S ou L; A62 corresponde a A ou S; e L63 corresponde a L ou V; e uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a D, N ou G; em que Y110

corresponde a Y, K, S, R ou T. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; e em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a S, A, C, G, D, N, T ou G; e em que Y110 corresponde a qualquer aminoácido. Noutras formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 11, em que G98 corresponde a G, S, A, C, V, N, D ou T; em que G99 corresponde a G, S, A, C, V, N, D ou T; em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a S, A, C, G, D, N, T ou G; e em que Y110 corresponde a qualquer aminoácido. Em algumas formas de realização, o polipéptido (tal como um anticorpo) compreende ainda uma região variável de cadeia leve de anticorpo.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 12, em que S26 corresponde a S ou F; D28 corresponde a D, S, A ou Y; e H32 corresponde a H, N ou Q; uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 13, em que I51 corresponde a I, T, V ou A; e S56 corresponde a S ou T; e uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a K, H, R ou S; e em que Y96 corresponde a Y ou R. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ.

ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a qualquer aminoácido; T93 corresponde a qualquer aminoácido; e em que Y96 corresponde a Y ou R. Em algumas formas de realização, o polipéptido (tal como um anticorpo) compreende ainda uma região variável de cadeia pesada de anticorpo.

São descritos igualmente polipéptidos (tal como um anticorpo) que compreendem (a) uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 9, em que I34 corresponde a S, L, V, A ou I; e N35 corresponde a N, T ou S; uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 10, em que M50 corresponde a M, I, G, Q, S ou L; A62 corresponde a A ou S; e L63 corresponde a L ou V; e uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a D, N ou G; e em que Y110 corresponde a Y, K, S, R ou T; e (b) uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 12, em que S26 corresponde a S ou F; D28 corresponde a D, S, A ou Y; e H32 corresponde a H, N ou Q; uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 13, em que I51 corresponde a I, T, V ou A; e S56 corresponde a S ou T; e uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a K, H, R ou S; e em que Y96 corresponde a Y ou R. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a qualquer aminoácido; T93 corresponde a qualquer aminoácido; e em que Y96 corresponde a Y ou R. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L

ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a S, A, C, G, D, N, T ou G; em que Y110 corresponde a qualquer aminoácido. Noutras formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ. ID N.º 11, em que G98 corresponde a G, S, A, C, V, N, D ou T; em que G99 corresponde a G, S, A, C, V, N, D ou T; em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a S, A, C, G, D, N, T ou G; e em que Y110 corresponde a qualquer aminoácido. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende ainda uma região variável de cadeia leve de anticorpo.

São descritos igualmente polipéptidos (tais como anticorpos) que compreendem uma região variável de cadeia pesada que compreende: (a) uma região CDR1 de SEQ. ID N.º 9, em que I34 corresponde a S, L, V A ou I; e N35 é substituído por N, T ou S; (b) uma região CDR2 de SEQ. ID N.º 10, em que M50 corresponde a I, G, Q, S ou L; A62 corresponde a A ou S; e L63 corresponde a L ou V; e (c) uma região CDR3 de SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a D, N ou G; e em que Y110 corresponde a Y, K, S, R ou T; em que o anticorpo liga o NGF.

São descritos igualmente polipéptidos (tais como anticorpos) que compreendem uma região variável de cadeia leve que compreende: (a) uma região CDR1 de SEQ. ID N.º 12, em que S26 corresponde a S ou F; D28 corresponde a D, S, A ou Y; e H32 corresponde a H, N ou Q; (b) uma região CDR2 de SEQ. ID N.º 13, em que I51 corresponde a I, T, V ou A; e S56 corresponde a S ou T; e (c) uma região CDR3 de SEQ. ID N.º 14, em que K92 corresponde a K, H, R ou S; e em que Y96 corresponde a Y ou R; em que o anticorpo liga o NGF.

São descritos igualmente polipéptidos (tais como anticorpos) que compreendem (a) uma região variável de cadeia pesada que compreende: (i) uma região CDR1 de SEQ. ID N.º 9, em que 134 é substituído por S, L, V, A ou I; e N35 é substituído por N, T ou S; (ii) uma região CDR2 de SEQ. ID N.º 10, em que M50 corresponde a I, G, Q, S ou L; A62 corresponde a A ou S; e L63 corresponde a L ou V; e (iii) uma região CDR3 de SEQ. ID N.º 11, em que Y100 corresponde a Y, L ou R; em que Y101 corresponde a Y ou W; em que G103 corresponde a G, A ou S; em que T104 corresponde a T ou S; em que S105 corresponde a S, A ou T; em que Y106 corresponde a Y, R, T ou M; em que Y107 corresponde a Y ou F; em que F108 corresponde a F ou W; em que D109 corresponde a D, N ou G; em que Y110 corresponde a Y, K, S, R ou T; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende: (i) uma região CDR1 de SEQ. ID N.º 12, em que S26 corresponde a S ou F; D28 corresponde a D, S, A ou Y; e H32 corresponde a H, N ou Q; (ii) uma região CDR2 de SEQ. ID N.º 13, em que I51 corresponde a I, T, V ou A; e S56 corresponde a S ou T; e (iii) uma região CDR3 de SEQ. ID N.º 14, em que S91 corresponde a S ou E; K92 corresponde a K, H, R ou S; e em que Y96 corresponde a Y ou R; em que o anticorpo liga o NGF.

Salvo indicação em contrário, a escolha (por ex. substituição) de um aminoácido numa localização é efetuada independentemente da seleção de um aminoácido em qualquer

outra localização.

Em algumas formas de realização, os polinucleótidos (tal como um anticorpo) ligam o NGF (tal como o NGF humano). Em algumas formas de realização, os polipéptidos compreendem qualquer uma das configurações de CDR (incluindo combinações, variações, etc.) aqui descritas.

Tal como é evidente a partir da descrição aqui apresentada, a numeração de regiões variáveis aqui utilizada é a numeração sequencial. Um perito na técnica compreende prontamente que existem diversos sistemas de numeração de anticorpos (tal como numeração de Kabat e de Chothia), e como converter a numeração sequencial noutro sistema de numeração, tal como numeração de Kabat ou numeração de Chothia.

É descrito igualmente um polipéptido (tal como um anticorpo) que compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma sequência CDR3) selecionada a partir da SEQ. ID N.º 46 ou 50. Noutras formas de realização ainda, o polipéptido compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos ilustradas nas SEQ. ID N.ºs 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Noutras formas de realização ainda, o polipéptido compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos ilustradas nas SEQ. ID N.ºs 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15.

É descrito igualmente um polipéptido (tal como um anticorpo) que compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR, tal como uma região CDRH1 e/ou CDR H2) selecionada a partir de (a) SEQ. ID N.ºs 28 e/ou 29; (b) SEQ. ID N.ºs 30 e/ou 31; (c) SEQ. ID N.ºs 32 e/ou 33; (d) SEQ. ID N.ºs 34 e/ou 35; (e) SEQ. ID N.ºs 36 e/ou 37; (f) SEQ. ID N.ºs 38 e/ou 39; e (g) SEQ. ID N.ºs 40 e 41. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR H1) selecionada a partir das SEQ. ID N.ºs 28, 30, 32, 34, 36, 38 e 40. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma

região CDR H2) selecionada a partir das SEQ. ID N.ºs 29, 31, 33, 35, 37, 39 e 41. Noutras formas de realização ainda, o polipéptido compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos ilustradas nas SEQ. ID N.ºs 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Noutras formas de realização ainda, o polipéptido compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos ilustradas nas SEQ. ID N.ºs 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15.

É descrito igualmente um polipéptido (tal como um anticorpo) que compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR, tal como uma região CDRL1 e/ou CDR L2) selecionada a partir de (a) SEQ. ID N.ºs 18 e/ou 19; (b) SEQ. ID N.ºs 20 e/ou 21; e (c) SEQ. ID N.ºs 22 e/ou 23. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR L1) selecionada a partir das SEQ. ID N.ºs 18, 20 e 22. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR L2) selecionada a partir das SEQ. ID N.ºs 19, 21 e 23. Noutras formas de realização ainda, o polipéptido compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos ilustradas nas SEQ. ID N.ºs 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Noutras formas de realização ainda, o polipéptido compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos ilustradas nas SEQ. ID N.ºs 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15.

Noutro aspeto, a invenção fornece um polipéptido (tal como um anticorpo) que compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR, tal como uma região CDRL3 e/ou CDR H3) selecionada a partir de (a) SEQ. ID N.ºs 51 e/ou 52; (b) SEQ. ID N.ºs 55 e/ou 56; (c) SEQ. ID N.ºs 57 e/ou 58; (d) SEQ. ID N.ºs 59 e/ou 60; (e) SEQ. ID N.ºs 61 e/ou 62; (f) SEQ. ID N.ºs 63 e/ou 64. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR L3) selecionada a partir das SEQ. ID N.ºs 51, 55, 57, 59, 61 e 63. Em algumas

formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR H3) selecionada a partir das SEQ. ID N.ºs 52, 56, 58, 60, 62 e 64. Noutras formas de realização ainda, o polipéptido compreende ainda uma sequência de aminoácidos ilustrada numa ou mais das SEQ. ID N.ºs 18, 19, 30 e 31. Noutras formas de realização ainda, o polipéptido compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos ilustradas nas SEQ. ID N.ºs 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Noutras formas de realização ainda, o polipéptido compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos ilustradas nas SEQ. ID N.ºs 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15.

Noutro aspeto, a invenção fornece um polipéptido (tal como um anticorpo) que compreende uma ou mais de uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR) ilustrada nas SEQ. ID N.ºs 61, 63, 18, 19, 30 e 31.

Num aspeto, a invenção fornece um anticorpo anti-NGF (tal como um anticorpo antagonista) que liga o NGF (tal como um NGF humano) com uma alta afinidade. Em algumas formas de realização, a alta afinidade corresponde (a) à ligação de NGF com uma K_D de menos de cerca de 2 nM (tal como qualquer valor de cerca de 1 nM, 800 pM, 600 pM, 400 pM, 200 pM, 100 pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM ou menos), e/ou uma k_{off} mais lenta do que cerca de $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; e/ou (b) à inibição (redução e/ou bloqueio) da sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer valor entre 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM ou menos; e/ou (c) à inibição (redução e/ou bloqueio) da sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 (na presença de cerca de 1,5 pM de NGF) de cerca de qualquer valor entre 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM ou menos; e/ou (d) à inibição (redução e/ou bloqueio) da

sobrevivência dependente de NGF de rato de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer valor entre 150 pM, 125 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM ou menos; e/ou (e) à inibição (redução e/ou bloqueio) da sobrevivência dependente de NGF de rato de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 (na presença de cerca de 1,5 pM de NGF) de cerca de qualquer valor entre 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM ou menos; e/ou (f) à ligação de NGF com afinidade mais alta em comparação com o recetor trkA.

Noutro aspeto, a invenção fornece polipéptidos (tal como um anticorpo), em que os polipéptidos (a) ligam o NGF (tal como o NGF humano) com uma K_D de menos de cerca de 2 nM (tal como qualquer valor de cerca de 1 nM, 800 pM, 600 pM, 400 pM, 200 pM, 100pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM ou menos), e/ou uma k_{off} mais lenta do que cerca de $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; e/ou (b) inibem a sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer valor entre 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM ou menos; e/ou (c) inibem a sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 (na presença de cerca de 1,5 pM de NGF) de cerca de qualquer valor entre 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM ou menos; e/ou ligam o NGF com afinidade mais alta em comparação com o recetor trkA. Em algumas formas de realização, os polipéptidos (a) ligam o NGF com uma K_D de menos de cerca de 2 nM; e/ou (b) inibem a sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 de cerca de 100 pM ou menos, em que o IC50 é medido na presença de cerca de 15 pM de NGF; e/ou (c) inibem a sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 de cerca

de 10 pM ou menos, em que o IC50 é medido na presença de cerca de 1,5 pM de NGF, e em que o IC50 é medido na presença de cerca de 15 pM de NGF. Em algumas formas de realização, os polipéptidos (a) ligam o NGF com uma K_D de menos de cerca de 100 pM; e/ou (b) inibem a sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 de cerca de 20 pM ou menos, em que o IC50 é medido na presença de cerca de 15 pM de NGF; e/ou (c) inibem a sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 de cerca de 2 pM ou menos, em que o IC50 é medido na presença de cerca de 1,5 pM de NGF.

Tal como é evidente a partir da descrição aqui apresentada, são especificamente excluídas da invenção as formas de realização de polipéptidos que consistem na sequência de aminoácidos idêntica para uma sequência de aminoácidos de anticorpo monoclonal de ratinho, 911. As sequências CDR alargadas de Mab 911 são ilustradas nas Figuras 1A e 1B e nas SEQ. ID N.ºs 9 a 14.

Em algumas formas de realização, a invenção fornece qualquer um dos anticorpos ou polipéptidos acima, em que o polipéptido (tal como um anticorpo) é isolado. Em algumas formas de realização, o polipéptido (tal como um anticorpo) é substancialmente purificado. Noutras formas de realização ainda, o polipéptido (tal como um anticorpo) é de afinidade maturada. Noutras formas de realização, o anticorpo é um anticorpo antagonista. Em algumas formas de realização, o polipéptido (tal como um anticorpo) compreende sequências de constituições humanas. Noutras formas de realização ainda, o polipéptido (tal como um anticorpo) compreende um ou mais resíduos de constituição não humana. Em algumas formas de realização, o polipéptido (tal como um anticorpo) liga o NGF (tal como o NGF humano) com uma K_D de 2 nM ou menos. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende uma ou mais (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou

mais) substituições de aminoácidos humanos em relação a uma sequência de aminoácidos não humanos (tal como uma sequência de regiões variáveis, tal como uma sequência CDR, tal como uma sequência de constituições). Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende pelo menos 1, pelo menos 2, ou mais, tais como pelo menos 3, 4, 5, 6, ou mais, substituições de aminoácidos em relação a uma sequência de aminoácidos de polipéptido precursor (tal como um sequência de aminoácidos de anticorpo 911, tal como qualquer uma ou mais das SED. ID N.ºs 9 a 14). Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação do anticorpo foi alterada (em algumas formas de realização, aumentada) em relação à afinidade de um anticorpo precursor (tal como Mab 911). Noutras formas de realização ainda, a afinidade de ligação do anticorpo é mais baixa do que afinidade de ligação do recetor trkA para o NGF (tal como o NGF humano). Em algumas formas de realização, os polipéptidos podem ser anticorpos. Em algumas formas de realização, os anticorpos são anticorpos humanos. Noutras formas de realização, os anticorpos são anticorpos humanizados. Noutras formas de realização ainda, os anticorpos são anticorpos monoclonais. Em algumas formas de realização, o anticorpo é um anticorpo de afinidade maturada.

A invenção fornece polinucleótidos (incluindo um polinucleótido isolado) que compreendem polinucleótidos que codificam qualquer uma das formas de realização acima.

Noutro aspeto, a invenção fornece um polinucleótido isolado que compreende um polinucleótido que codifica um fragmento ou uma região do anticorpo E3 (aqui alternadamente denominado "E3"). Numa forma de realização, o fragmento é uma cadeia leve do anticorpo E3, conforme ilustrado na Figura 1B. Noutra forma de realização, o fragmento é uma cadeia pesada do anticorpo E3, conforme ilustrado na Figura 1A. Ainda noutra forma de realização, o fragmento contém uma ou mais regiões variáveis de uma

cadeia leve e/ou de uma cadeia pesada do anticorpo E3. Ainda noutra forma de realização, o fragmento contém uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de uma cadeia leve e/ou de uma cadeia pesada do anticorpo E3, conforme ilustrado na Figuras 1A e 1B.

Noutro aspeto, a invenção corresponde a um polinucleótido isolado que compreende um polinucleótido que codifica um anticorpo E3. Em algumas formas de realização, o polinucleótido compreende um ou ambos os polinucleótidos ilustrados nas Figuras 2 e 3.

Noutro aspeto, a invenção corresponde a um polinucleótido isolado que codifica uma cadeia leve E3 com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4893 ou ATCC N.º PTA-4894. Noutro aspeto, a invenção corresponde a um polinucleótido isolado que codifica uma cadeia pesada E3 com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895. Ainda noutro aspeto, a invenção corresponde a um polinucleótido isolado que compreende (a) uma região variável codificada no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4893 ou PTA-4894 e (b) uma região variável codificada no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895. Noutro aspeto, a invenção corresponde a um polinucleótido isolado que compreende (a) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4893 ou PTA-4894; e/ou (b) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895.

Noutro aspeto, a invenção fornece polinucleótidos que codificam qualquer um dos anticorpos (incluindo fragmentos de anticorpo) ou polipéptidos aqui descritos.

Noutro aspeto, a invenção fornece vetores (incluindo vetores de expressão e clonagem) e células hospedeiras que compreendem qualquer um dos polinucleótidos aqui divulgados.

Tal como é evidente a partir da descrição aqui

apresentada, são especificamente incluídas a partir da invenção as formas de realização de polinucleótidos que consistem na sequência de polinucleótidos idêntica para uma sequência de polinucleótidos de anticorpo monoclonal de ratinho, 911. As sequências CDR alargadas de Mab 911 são ilustradas nas Figuras 1A e 1B e nas SEQ. ID N.ºs 9 a 14.

Noutro aspeto, a invenção corresponde a uma célula hospedeira que compreende um polinucleótido que codifica uma cadeia leve E3 e um polinucleótido que codifica uma cadeia pesada E3, em que o polinucleótido que codifica uma cadeia leve E3 tem um número de depósito de ATCC N.º PTA-4893 e/ou ATCC N.º PTA-4894, e o polinucleótido que codifica uma cadeia pesada E3 tem um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira compreende um polinucleótido que codifica (a) uma região variável codificada no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4893 ou PTA-4894 e/ou (b) uma região variável codificada no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira compreende um polinucleótido que codifica (a) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4893 ou PTA-4894; e/ou (b) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

É descrito igualmente um complexo de NGF ligado pelo anticorpo E3. Noutro aspeto, o complexo é isolado. Noutro aspeto, o complexo é substancialmente purificado.

É descrito igualmente um complexo de NGF ligado por qualquer um dos anticorpos ou polipéptidos aqui descritos. Noutro aspeto, o complexo é isolado. Noutro aspeto, o complexo é substancialmente purificado.

Noutro aspeto, a invenção corresponde a uma composição farmacêutica que compreende qualquer um dos polipéptidos

(incluindo anticorpos, tal como o anticorpo E3) ou polinucleótidos aqui descritos, tais como composições farmacêuticas que compreendem o anticorpo E3 ou um anticorpo que compreende um fragmento do anticorpo E3, e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Noutro aspeto, a invenção corresponde a um método de geração do anticorpo E3 que compreende a preparação de uma célula hospedeira que compreende um vetor de expressão que codifica o anticorpo E3; a cultura da célula hospedeira ou a progenitura da mesma em condições que permitem a produção do anticorpo E3; e a purificação do anticorpo E3. Em algumas formas de realização, o vetor de expressão compreende uma ou ambas as sequências de polinucleótidos ilustradas nas Figuras 2 e 3.

Noutro aspeto, a invenção corresponde a um método de geração do anticorpo E3 que compreende a expressão de um polinucleótido que codifica a cadeia leve E3 e um polinucleótido que codifica a cadeia pesada E3 numa célula adequada, em que o polinucleótido que codifica a cadeia leve E3 tem um número de depósito de ATCC N.º PTA-4893 e/ou ATCC N.º PTA-4894, e o polinucleótido que codifica a cadeia pesada E3 tem um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895; geralmente seguido pela recuperação e/ou isolamento do anticorpo.

Noutro aspeto, a invenção fornece métodos de geração de qualquer um dos polipéptidos (tais como anticorpos) aqui descritos mediante a expressão de um ou mais polinucleótidos que codificam o anticorpo (que pode ser expressado separadamente como uma cadeia leve ou pesada única, ou uma cadeia leve e uma pesada podem ser expressadas a partir de um vetor) numa célula adequada, geralmente seguidos pela recuperação e/ou isolamento do anticorpo ou polipéptidos de interesse.

É descrito igualmente um método de antagonismo da atividade biológica de NGF (tal como o NGF humano)

utilizando qualquer um dos polipéptidos (incluindo anticorpos, tais como o anticorpo E3) aqui divulgados. Numa forma de realização, o método compreende a colocação do fator de crescimento do nervo humano em contacto com qualquer um dos polipéptidos (incluindo o anticorpo E3) aqui descritos, em que a atividade NGF (tal como a atividade do fator de crescimento do nervo humano) é antagonizada, reduzida, bloqueada ou suprimida.

É descrito igualmente um método de deteção do NGF utilizando qualquer um dos polipéptidos (incluindo anticorpos, tal como o anticorpo E3) aqui descritos. A presença de NGF é detetada através da deteção de um complexo entre o NGF e qualquer um dos polipéptidos aqui descritos (tal como o anticorpo E3). O termo "deteção", conforme aqui utilizado, inclui a deteção qualitativa e/ou quantitativa (níveis de medição) com ou sem referência a um controlo.

Noutro aspeto, o anticorpo da invenção é utilizado num método de tratamento da dor mediante administração de uma quantidade eficaz de uma composição que compreende o anticorpo E3 ou qualquer uma das formas de realização de polipéptidos (incluindo o anticorpo) ou de polinucleótidos aqui descritas. Em algumas formas de realização, a dor é uma dor pós-cirúrgica.

É descrito igualmente um método de prevenção ou tratamento da dor de artrite reumatoide num indivíduo mediante administração de uma quantidade eficaz de anticorpo antagonista anti-NGF no indivíduo. Foi demonstrado, de acordo com a invenção, que um anticorpo antagonista anti-NGF é capaz de inibir ou bloquear a dor associada a artrite reumatoide. Em algumas formas de realização, a dor é mitigada num prazo de cerca de 24 horas após a administração do anticorpo antagonista anti-NGF. Em algumas formas de realização, a dor é mitigada num prazo de cerca de 4 dias após a administração do anticorpo

antagonista anti-NGF. Em algumas formas de realização, a dor é mitigada antes da observação ou na ausência de uma indicação de melhora da condição inflamatória do indivíduo.

São descritos igualmente métodos de redução da incidência da dor de artrite reumatoide, melhoramento da dor de artrite reumatoide, supressão da dor de artrite reumatoide, atenuação da dor de artrite reumatoide e/ou adiamento do começo, do desenvolvimento ou da progressão da dor de artrite reumatoide num indivíduo, em que os referidos métodos compreendem a administração de uma quantidade eficaz de anticorpo antagonista anti-NGF no indivíduo.

É descrito igualmente um método de prevenção ou tratamento da dor de osteoartrite num indivíduo mediante administração de uma quantidade eficaz de anticorpo antagonista anti-NGF no indivíduo.

São descritos igualmente métodos de tratamento de caquexia inflamatória (perda de peso) associada a artrite reumatoide num indivíduo, que compreendem a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF. Além disso, são descritos métodos de redução da incidência da dor de osteoartrite, melhoramento da dor de osteoartrite, supressão da dor de osteoartrite, atenuação da dor de osteoartrite e/ou adiamento do começo, do desenvolvimento ou da progressão da dor de osteoartrite num indivíduo, em que os referidos métodos compreendem a administração de uma quantidade eficaz de anticorpo antagonista anti-NGF no indivíduo.

Noutro aspeto, a invenção fornece kits e composições que compreendem qualquer uma ou mais das composições aqui descritas. Estes kits, geralmente numa embalagem adequada e fornecidos com instruções apropriadas, são úteis para qualquer um dos métodos aqui descritos.

A invenção fornece igualmente qualquer um dos anticorpos, composições e kits descritos para qualquer

utilização aqui descrita, seja no contexto da utilização como medicamento e/ou seja na utilização para fabrico de um medicamento.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIGURA 1A: ilustra a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada do anticorpo E3 (designado por "6" e "5 + maturação de afinidade H3"). As CDRs de Chothia e CDRs de Kabat são representadas por texto sublinhado e texto a negrito e em itálico, respetivamente. A Figura 1A ilustra igualmente o alinhamento das seguintes sequências de aminoácidos da região variável de cadeia pesada; (2) a sequência de aceitadores de linha germinal humana VH4-59 (designado por "VH4-59" ou "2"); (3) as sequências de aceitadores enxertadas com as CDRs alargadas do anticorpo 911 de ratinho (designado por "enxertado com CDR" ou "3"); (4) as sequências de aceitadores enxertadas com CDR incluindo a substituição V71K (designado por "3+uma mutação de estrutura" ou "4"); (5) o clone contendo CDRs H1 e H2 de afinidade maturada (designado por "5" ou "4+ maturação de afinidade H1, H2"); e o anticorpo E3 (conforme descrito acima).

FIGURA 1B: ilustra a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve do anticorpo E3 (designado por "5" ou "4 + maturação de afinidade L3"). As CDRs de Chothia e CDRs de Kabat são representadas por texto sublinhado e texto a negrito e em itálico, respetivamente. A Figura 1B ilustra igualmente o alinhamento das seguintes sequências de aminoácidos da região variável de cadeia leve: (2) a sequência de aceitadores de linha germinal humana 08 (designado por "08" ou "2"); (3) as sequências de aceitadores enxertadas com as CDRs alargadas do anticorpo 911 de ratinho (designado por "enxertado com CDR" ou "3"); (4) as sequências de aceitadores enxertadas com CDR (designado por "3+ maturação de afinidade L1, L2" ou "4"); (5) o clone que contém CDRs L1 e L2 de afinidade maturada

(designado por "5" ou "4+ mutação de afinidade L3"); e o anticorpo E3 (conforme descrito acima).

FIGURA 2: ilustra um polinucleótido que compreende uma sequência de polinucleótidos que codifica a região variável de cadeia pesada do anticorpo E3.

FIGURA 3: ilustra um polinucleótido que compreende uma sequência de polinucleótidos que codifica a região variável de cadeia leve do anticorpo E3.

FIGURA 4: é um gráfico que representa a sobrevivência dependente de NGF de neurónios E13.5 na presença de uma concentração variável de NGF humano e de rato. O eixo X corresponde à concentração de NGF (ng/ml) e o eixo Y corresponde aos neurónios contados.

FIGURA 5: é um gráfico que compara o efeito de bloqueio de NGF de vários Fabs na presença de 0,04 ng/ml de NGF humano (aproximadamente 1,5 pM; ilustrado no painel inferior) ou 0,4 ng/ml de NGF humano (aproximadamente 15 pM; ilustrado no painel superior). Foi estimada a sobrevivência de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho em várias concentrações de Fab E3; 911 Fab murino; e Fab H19-L129 e Fab 8L2-6D5. O IC50 (em pM) foi calculado para cada Fab em cada concentração de NGF, tal como é ilustrado na Tabela 9. O Fab E3 bloqueou fortemente a sobrevivência de neurónios trigeminais dependente de NGF humano, com um IC50 de aproximadamente 21 pM na presença de 15 pM de NGF humano, e um IC50 de aproximadamente 1,2 pM na presença de 1,5 pM de NGF humano. Os Fabs 3C e H19-L129 também bloquearam fortemente a sobrevivência de neurónios trigeminais dependente de NGF humano. Em ambos os painéis, o eixo X corresponde à concentração de anticorpo (nM) e o eixo Y corresponde aos neurónios contados. 1,5 pM de NGF estavam em torno do IC50, enquanto 15 pM representavam uma concentração de saturação de NGF.

FIGURA 6: é um gráfico que compara o efeito de bloqueio de NGF de vários Fabs na presença de 0,04 ng/ml de

NGF de rato (aproximadamente 1,5 pM; ilustrado no painel inferior) ou 0,4 ng/ml de NGF de rato (aproximadamente 15 pM; ilustrado no painel superior). A sobrevivência de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho em várias concentrações de Fab E3; Fab 911 murino; e Fab H19-L129 e 8L2-6D5 foi estimada conforme descrito acima. O IC50 (em pM) foi calculado para cada Fab em cada concentração de NGF, tal como é ilustrado na Tabela 9. O Fab E3 bloqueou fortemente a sobrevivência de neurónios trigeminais dependente de NGF humano, com um IC50 de aproximadamente 31,6 pM na presença de 15 pM de NGF de rato, e um IC50 de aproximadamente 1,3 pM na presença de 1,5 pM de NGF de rato. Os Fabs 3C e H19-L129 também bloquearam fortemente a sobrevivência de neurónios trigeminais dependente de NGF de rato. 1,5 pM de NGF estavam em torno do IC50, enquanto 15 pM representavam uma concentração de saturação de NGF. Em ambos os painéis, o eixo X corresponde à concentração de anticorpo (nM) e o eixo Y corresponde aos neurónios contados.

FIGURA 7: é um gráfico que representa a dor em repouso estimada 24 horas após a cirurgia e mostra que o tratamento com 0,02 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,6 mg/kg ou 1 mg/kg de anticorpo E3 anti-NGF reduziu a dor. “*” indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,5$) do controlo negativo.

FIGURA 8: é um gráfico que representa a dor em repouso estimada 24 horas após a cirurgia e mostra que o tratamento com 0,5 mg/kg de anticorpo E3 anti-NGF reduziu significativamente ($p < 0,005$) a dor em repouso quando injetado duas horas após a cirurgia.

FIGURA 9: é um gráfico que mostra os resultados da análise BIAcore da afinidade de ligação ao NGF humano do anticorpo de ratinho 911 (Fab). O anticorpo de ratinho 911 ligou o NGF com uma K_D de 3,7 nM, k_{off} de $8,4 \times 10^{-5} s^{-1}$ e k_{on} de $2,2 \times 10^4 Ms^{-1}$.

FIGURA 10: é um gráfico que mostra os resultados da análise BIAcore da afinidade de ligação ao NGF humano do anticorpo E3 (Fab) (referido como "3E Fab"). O E3 ligou o NGF humano com uma K_D de aproximadamente 0,07 nM (e com uma k_{on} de cerca de $6,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, e uma k_{off} de cerca de $4,2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$).

FIGURA 11: é um gráfico que ilustra que o anticorpo E3 bloqueia a interação do NGF com os respectivos recetores, trkA e p75, conforme estimado pela percentagem de ligação detetada entre NGF e trkA (ilustrado como círculos pretos) e NGF e p75 (ilustrado como quadrados vazios). O eixo X corresponde à concentração de anticorpo 3E (Fab) e o eixo Y corresponde à ligação de NGF (percentagem máxima de RU). As concentrações maiores de Fab E3 bloquearam a interação do NGF com p75 e trkA, conforme ilustrado pelo sinal diminuído (medido em RU). Quando a concentração de anticorpo E3 (Fab) igualou a concentração de NGF, não foi observada nenhuma ligação de NGF (conforme ilustrado por um sinal de zero).

FIGURA 12: é um gráfico que representa a capacidade de bloqueio de NGF humano do anticorpo inteiro E3 e Fab E3. Foi estimada a sobrevivência de neurónios trigeminais de ratinho E13.5 na presença de NGF humano e várias concentrações de Fab E3 e anticorpo E3. O eixo X corresponde a locais de ligação de NGF (nM) e o eixo Y corresponde à contagem normalizada de neurónios trigeminais (TG). O anticorpo inteiro E3 e Fab 3E mostraram níveis semelhantes de inibição de sobrevivência dependente de NGF de neurónios trigeminais quando a concentração de todo o anticorpo e Fab foi normalizada para o número de locais de ligação de NGF (Fab tem um local de ligação e todo o anticorpo tem dois locais de ligação).

FIGURA 13: é um gráfico que representa a capacidade de várias concentrações (20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 0,0064, 0,00128 e 0,0 nM) de anticorpo E3 (triângulos cheios; referido como "3E"), anticorpo 911 (círculos cheios), e uma

imunoadesina de recetor trkA (quadrados sombreados; referido como "trkA-Fc") para inibir a sobrevivência dependente de NGF de neurónios trigeminais E13.5 na presença de 0,4 ng/ml de NGF humano (condições de saturação). O eixo X corresponde à concentração de anticorpo (nM) e a concentração Y corresponde aos neurónios contados. Estes resultados demonstraram que o anticorpo E3 bloqueou o NGF significativamente melhor do que o anticorpo anti-NGF monoclonal de ratinho 911 ou a imunoadesina trkA.

FIGURA 14: é um gráfico que ilustra que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 (denominado "3E" na figura) ou Fab 911 não inibiu a sobrevivência neuronal provocada por NT3, NT4/5 e MSP, mesmo nas concentrações de anticorpo tão elevadas como 200 nM. Os dados representaram a percentagem média de sobrevivência após 48 horas na cultura (\pm erro padrão da média, n=3 para cada ponto de dados) em relação à sobrevivência observada no controlo positivo para cada experiência (100% de sobrevivência de neurónios trigeminais desenvolvidos na presença de concentração de NGF de saturação). Várias concentrações (20 nM, 2 nM ou 0,2 nM) de E3 Fab (denominado "3E" na figura) e anticorpo de ratinho 911 Fab foram utilizadas na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "controlo"), 400 pM de NGF (denominado "NGF-400pM"), 10 nM de NT3 (denominado "NT3-10nM") ou 600 pM de MSP (denominado "MSP-600 pM").

FIGURA 15: é um gráfico que ilustra que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 (Fab ou anticorpo inteiro) (denominado "3E" na figura) ou anticorpo de ratinho 911 (Fab ou anticorpo inteiro) não inibiu a sobrevivência neuronal provocada por NT3, NT4/5 e MSP, mesmo em concentrações de anticorpo tão elevadas como 200 nM. Várias concentrações (200 nM e 80 nM) de E3 Fab, anticorpo inteiro, anticorpo de ratinho 911, anticorpo inteiro e Fab foram utilizadas na presença de nenhuma neurotrofina adicionadas (denominado "sem fator"), 400 pM de NGF

(denominado "NGF-400pM"), 10 nM de NT3 (denominado "NT3-10nM") ou 600 pM de MSP (denominado "MSP-600 pM").

FIGURA 16: é um gráfico que ilustra que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 ou Fab E3 não inibiu a sobrevivência de neurónios nodosos E17 provocada por BDNF, NT4/5 ou LIF. O anticorpo antagonista anti-NGF de ratinho 911 foi igualmente testado, e foram observados resultados semelhantes. Várias concentrações (200 nM ou 80 nM) de anticorpo inteiro E3 (denominado "3E" na figura), Fab E3, anticorpo inteiro 911 ou Fab 911 foram testadas na presença de nenhuma neurotrofinas adicionadas (denominado "sem fatores"), 400 pM de BDNF (denominado "BDNF-400pM"), 400 pM de NT4/5 (denominado "NT4/5-400pM") ou 2,5 nM de LIF (denominado "LIF-2,5 nM").

FIGURA 17: é um gráfico que ilustra que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 ou Fab E3 não inibiu a sobrevivência de neurónios nodosos E17 provocada por BDNF, NT4/5 ou LIF. Várias concentrações (200 nM, 20 nM, 2nM) de Fab E3 (denominado "3E" na figura) ou Fab 911 foram testadas na presença de nenhuma neurotrofinas adicionadas (denominado "controlo"), 400 pM de BDNF (denominado "BDNF-400pM"), 400 pM de NT4/5 (denominado "NT4/5-400pM") ou 2,5 nM de LIF (denominado "LIP-2,5 nM").

FIGURA 18: é um gráfico que demonstra a resposta nocicetiva em ratos artríticos (modelo de artrite reumatoide) após a administração de anticorpos anti-NGF (E3 e 911) no D14 e D19. Foram administrados E3 (1mg/kg, i.v. no dia 14 e dia 19), 911 (10 mg/kg, i.v. no dia 14 e dia 19) ou indo (3 mg/kg de indometacina, p.o diariamente durante 10 dias) nos ratinhos artríticos. Os valores de intensidade de vocalização são expressados em mV como médias \pm EPM.

FIGURA 19: é um gráfico que demonstra os efeitos dos anticorpos anti-NGF no peso corporal na artrite em ratos (modelo de artrite reumatoide) após a administração de

anticorpos anti-NGF no D14 e D19. Foram administrados E3 (1mg/kg, i.v. no dia 14 e dia 19), 911 (10 mg/kg, i.v. no dia 14 e dia 19) ou indo (3 mg/kg de indometacina, p.o. diariamente durante 10 dias) nos ratinhos artríticos. Os valores de peso corporal são expressados em gramas como média \pm EPM.

FIGURA 20: é um gráfico que demonstra a resposta nocicetiva em ratos artríticos (modelo de artrite reumatoide) após a administração de doses diferentes de anticorpo anti-NGF E3 (0,003 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg e 5 mg/kg) no D14 e D18. Os valores de intensidade de vocalização são expressados em mV como médias \pm EPM.

FIGURA 21: é um gráfico que demonstra os efeitos de anticorpo anti-NGF E3 na percentagem de peso no Dia 14 (normalizado no Dia 14) em ratos artríticos (modelo de artrite reumatoide) após a administração de doses diferentes de anticorpo anti-NGF E3 (0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg e 5 mg/kg) no D14 e D18.

FIGURA 22: é um gráfico que demonstra os efeitos de anticorpo anti-NGF E3 na perda de peso em ratos artríticos (modelo de artrite reumatoide) após a administração de doses diferentes de anticorpo anti-NGF E3 (0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg e 5 mg/kg) no D14 e D18. Os valores de perda de peso estavam normalizados no Dia 0.

FIGURA 23: representa a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada E3 (Fig. 23A) e a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve (Fig. 23B), conforme numerado utilizando numeração sequencial, numeração de Kabat e numeração de Chothia.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção aqui divulgada fornece anticorpos antagonistas anti-NGF que ligam o NGF (tal como o NGF humano) com alta afinidade. A invenção fornece ainda anticorpos e polipéptidos derivados do E3 que liga o NGF, e métodos de criação e utilização destes anticorpos. Em

algumas formas de realização, a invenção fornece um anticorpo humanizado, E3, que liga ao fator de crescimento do nervo ("NGF"), e métodos de criação de utilização deste anticorpo. A invenção fornece igualmente polipéptidos E3 (incluindo anticorpos) que ligam o NGF, e polinucleótidos que codificam o polipéptido e/ou anticorpo E3.

São descritos igualmente métodos de prevenção e/ou tratamento da dor de artrite reumatoide num indivíduo mediante administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF.

São descritos igualmente métodos de prevenção e/ou tratamento da dor de osteoartrite num indivíduo mediante administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF.

São descritos igualmente métodos de ajuste da afinidade de um anticorpo e métodos de caracterização de uma região CDR.

Técnicas Gerais

A prática da presente invenção irá utilizar, salvo indicação em contrário, técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular, bioquímica e imunologia, que estão inseridas no âmbito da técnica. Essas técnicas são explicadas integralmente na literatura, tal como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edição (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths e D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental*

Immunology (D.M. Weir e C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); e *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Definições

Um "anticorpo" é uma molécula de imunoglobulina capaz de uma ligação específica a um alvo, tal como um hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipeptido, etc., através de, pelo menos, um local de reconhecimento do antigénio, situado na região variável da molécula de imunoglobulina. Conforme aqui utilizado, o termo abrange não só anticorpos policlonais ou monoclonais intactos, como também fragmentos dos mesmos (tais como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadeia única (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão que compreendem uma porção de anticorpo, e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreenda um local de reconhecimento do antigénio. Um anticorpo inclui um anticorpo de qualquer classe, tal como IgG, IgA ou IgM (ou subclasse do mesmo), e o anticorpo não necessita de ser de nenhuma classe específica. Dependendo da sequência de aminoácidos do anticorpo do domínio constante das respectivas cadeias pesadas, as

imunoglobulinas podem ser atribuídas a classes diferentes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e diversas destas podem ser ainda divididas em subclasses (isotipos), por ex. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem a classes diferentes de imunoglobulinas chamam-se alfa, delta, épsilon, gama e mu, respetivamente. As estruturas de subunidade e as configurações tridimensionais de classes diferentes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

“Fv” é um fragmento de anticorpo que contém um local de ligação e de reconhecimento do antígeno completo. Numa espécie Fv de duas cadeias, esta região consiste num dímero de domínio variável de uma cadeia pesada e uma leve em associação próxima e não covalente. Numa espécie Fv de cadeia única, o domínio variável de uma cadeia pesada e uma leve pode ser ligado de forma covalente por um ligante de péptido flexível, de modo a que as cadeias leves e pesadas possam ser associadas numa estrutura dimérica análoga à existente numa espécie Fv de duas cadeias. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir uma especificidade de ligação do antígeno na superfície do dímero VH-VL. Contudo, até um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas 3 CDRs específicas para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e ligar o antígeno, embora geralmente numa afinidade mais baixa em comparação com o local de ligação total.

O fragmento Fab contém igualmente o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab na adição de alguns resíduos no carboxi-terminal do domínio CH1 de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas das regiões de charneira do anticorpo.

Um “anticorpo monoclonal” refere-se a uma população de

anticorpos homogénea, em que o anticorpo monoclonal é constituído por aminoácidos (que ocorrem de forma natural e que ocorrem de forma não natural) que estão envolvidos na ligação seletiva de um antigénio. Uma população de anticorpos monoclonais é altamente específica, e é direcionada para um único local antigénico. O termo "anticorpo monoclonal" abrange não só anticorpos monoclonais intactos e anticorpos monoclonais completos, como também fragmentos dos mesmos (tais como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadeia única (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão que compreendem uma porção de anticorpo, e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreenda um local de reconhecimento do antigénio da especificidade requerida e a capacidade de ligar a um antigénio. Não pretende ser limitado quanto à fonte do anticorpo ou ao modo como é criado (por ex. por hibridoma, seleção de bacteriófagos, expressão recombinante, animais transgénicos, etc.).

Conforme aqui utilizado, "anticorpo humano" significa um anticorpo que contém uma sequência de aminoácidos correspondente à de um anticorpo produzido por um ser humano e/ou criado utilizando qualquer uma das técnicas para criar anticorpos humanos conhecidas na técnica ou aqui divulgadas. Esta definição de um anticorpo humano inclui anticorpos que compreendem, pelo menos, um polipéptido de cadeia pesada humana ou, pelo menos, um polipéptido de cadeia leve humana. Um desses exemplos é um anticorpo que compreende polipéptidos de cadeia leve murina e cadeia pesada humana. Os anticorpos humanos podem ser produzidos utilizando várias técnicas conhecidas na técnica. Numa forma de realização, o anticorpo humano é selecionado a partir de uma biblioteca de bacteriófagos, em que essa biblioteca de bacteriófagos expressa anticorpos humanos (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS*, (EUA) 95:6157-6162; Hoogenboom e

Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Os anticorpos humanos podem ser igualmente criados introduzindo lócus de imunoglobulina humana nos animais transgênicos, por ex. ratinhos nos quais os genes de imunoglobulina endógena tenham sido tornados inativos parcial ou completamente. Esta abordagem é descrita nas Patentes U.S. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; e 5.661.016. Em alternativa, o anticorpo humano pode ser preparado mediante a imortalização de linfócitos B humanos que produzem um anticorpo direcionado para um antigénio-alvo (esses linfócitos B podem ser recuperados a partir de um indivíduo ou podem ter sido imunizados *in vitro*). Consulte, por ex., Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; e a Patente U.S. 5.750.373.

O termo "anticorpos quiméricos" refere-se aos anticorpos em que uma porção de cada uma das sequências de aminoácidos de cadeias pesadas e leves é homóloga às sequências correspondentes nos anticorpos derivados de uma determinada espécie ou pertencentes a uma determinada classe, enquanto o segmento restante das cadeias é homólogo às sequências correspondentes noutros anticorpos. Normalmente, nestes anticorpos quiméricos, a região variável das cadeias leves e pesadas imita as regiões variáveis dos anticorpos derivados de uma espécie de mamíferos, enquanto as porções constantes são homólogas às sequências nos anticorpos derivados de outra espécie. Uma vantagem clara destas formas quiméricas é o facto de, por exemplo, as regiões variáveis poderem ser convenientemente derivadas de origens conhecidas presentemente, utilizando células B ou hibridomas prontamente disponíveis de organismos hospedeiros não humanos em conjunto com regiões constantes derivadas de, por exemplo, preparações de células humanas. Enquanto a região variável tem a vantagem

da facilidade de preparação, e de a especificidade não ser afetada pela respetiva fonte, a região constante sendo humana tem menos probabilidade de deduzir uma resposta imunitária de uma pessoa quando os anticorpos são injetados do que uma região constante de uma fonte não humana. Contudo, a definição não se limita a este exemplo específico.

Uma "região Fc funcional" tem, pelo menos, uma função efetora de uma região Fc de sequência nativa. As "funções efetoras" exemplares incluem ligação de Clq; citotoxicidade dependente do complemento (CDC); ligação de recetor Fc; citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC); fagocitose; e diminuição de recetores de superfície celular (por ex., recetor de célula B, BCR), etc. Geralmente, essas funções efetoras necessitam que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (por ex. um domínio variável de anticorpo) e podem ser estimadas utilizando vários ensaios conhecidos na técnica para avaliar essas funções efetoras de anticorpo.

Uma "região Fc de sequência nativa" compreende uma sequência de aminoácidos idêntica à sequência de aminoácidos de uma região Fc encontrada na natureza. Uma "região Fc variante" compreende uma sequência de aminoácidos que difere da de uma região Fc de sequência nativa em virtude de, pelo menos, uma modificação de aminoácidos, mas mantém, pelo menos, uma função efetora da região Fc de sequência nativa. Preferencialmente, a região Fc variante tem, pelo menos, uma substituição de aminoácidos em comparação com uma região Fc de sequência nativa ou com a região Fc de um polipéptido precursor, por ex. entre cerca de uma a cerca de dez substituições de aminoácidos, e preferencialmente entre cerca de uma a cerca de cinco substituições de aminoácidos numa região Fc de sequência nativa ou na região Fc do polipéptido precursor. A região Fc variante terá preferencialmente, pelo menos,

cerca de 80% de identidade de sequência com uma região Fc de sequência nativa e/ou com uma região Fc de um polipéptido precursor, e mais preferencialmente, pelo menos, cerca de 90% de identidade de sequência, e ainda mais preferencialmente, pelo menos, cerca de 95% de identidade de sequência.

Conforme aqui utilizado, "citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos" e "ADCC" referem-se a uma reação mediada por células, na qual as células citotóxicas não específicas que expressam recetores Fc (FcRs) (por ex. células assassinas naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) reconhecem o anticorpo ligado numa célula-alvo e causam subsequentemente a lise da célula-alvo. A atividade ADCC de uma molécula de interesse pode ser estimada utilizando um ensaio ADCC *in vitro*, tal como descrito na Patente U.S. 5.500.362 ou 5.821.337. As células efetoras úteis para esses ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células NK. Em alternativa, ou além disso, a atividade ADCC da molécula de interesse pode ser estimada *in vivo*, por ex. num modelo animal, conforme divulgado em Clynes et al., 1998, *PNAS* (EUA), 95:652-656.

Conforme aqui utilizado, "recetor Fc" e "FcR" descrevem um recetor que liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de sequência nativa. Além disso, um FcR preferido é um que liga um anticorpo IgG (um recetor gama) e inclui recetores das subclasses Fc γ RI, FcF γ RII e FcF γ RIII, incluindo variantes alélicas e, em alternativa, formas juntas destes recetores. Os recetores FcF γ RII incluem FcF γ RIIA (um "recetor de ativação") e FcF γ RIIB (um "recetor de inibição"), que têm sequências de aminoácidos semelhantes que diferem essencialmente nos domínios citoplasmáticos das mesmas. Os FcRs são revistos em Ravetch e Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel et al., 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; e de Haas et al., 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41. "FcR" inclui

igualmente o recetor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternos para o feto (Guyer et al., 1976, *J. Immunol.*, 117:587; e Kim et al., 1994, *J. Immunol.*, 24:249).

A "citotoxicidade dependente do complemento" e "CDC" referem-se à provocação de lise num alvo na presença de complemento. A via de ativação do complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema do complemento (Clq) a uma molécula (por ex. um anticorpo) complexa com um antigénio cognato. Para estimar a ativação do complemento, pode ser efetuado um ensaio CDC, por ex. conforme descrito em Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

Conforme aqui utilizado, os termos "E3", "3E" e "anticorpo E3" são utilizados alternadamente para fazer referência a um anticorpo que compreende a sequência de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve ilustradas nas Figuras 1A (SEQ. ID N.º 1) e 1B (SEQ. ID N.º 2), respetivamente. As porções de CDR do anticorpo E3 (incluindo CDRs de Chothia e de Kabat) são representadas esquematicamente nas Figuras 1A e 1B. As Figuras 2 e 3 ilustram polinucleótidos que codificam cadeias pesadas e leves, respetivamente, compreendendo as regiões variáveis de cadeia pesada e leve ilustradas nas Figuras 1A e 1B, respetivamente. A geração e a caracterização de E3 são descritas nos Exemplos. São associadas funções biológicas diferentes a E3, incluindo, mas sem limitação, a capacidade de ligar ao NGF e inibir a atividade biológica de NGF e/ou as vias a jusante mediadas pela sinalização de NGF; e a capacidade de inibir a sobrevivência dependente de NGF de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho. Conforme aqui apresentado, os anticorpos da invenção podem ter qualquer uma ou mais destas características. Em algumas formas de realização, o termo "E3" refere-se a imunoglobulina codificada por (a) um polinucleótido que codifica a cadeia

leve E3 que tem um número de depósito de ATCC N.º PTA-4893 ou ATCC N.º PTA-4894, e (b) um polinucleótido que codifica uma cadeia pesada E3 que tem um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895.

Conforme aqui utilizado, a ligação de "imunidade específica" de anticorpos refere-se à interação de ligação específica do antigénio que ocorre entre o local de combinação do antigénio de um anticorpo e o antigénio específico reconhecido por esse anticorpo (ou seja, o anticorpo reage com a proteína num ensaio ELISA ou outro imunoenensaio, e não reage de forma detetável com proteínas não relacionadas).

Um epítopo que "liga especificamente" ou "liga preferencialmente" (aqui utilizado alternadamente) a um anticorpo ou um polipéptido é um termo bem interpretado na técnica, e os métodos para determinar essa ligação específica ou preferencial são igualmente bem conhecidos na técnica. É suposto uma molécula mostrar a "ligação específica" ou a "ligação preferencial" se reagir ou for associada de forma mais frequente, mais rápida, com maior duração e/ou com maior afinidade a uma determinada célula ou substância do que a substâncias ou células alternativas. Um anticorpo "liga especificamente" ou "liga preferencialmente" a um alvo se ligar com maior afinidade, avidéz, mais prontamente e/ou com maior duração do que liga a outras substâncias. Por exemplo, um anticorpo que liga específica ou preferencialmente a um epítopo NGF é um anticorpo que liga este epítopo com maior afinidade, avidéz, mais prontamente e/ou com maior duração do que liga a outros epítopos NGF ou epítopos não NGF. Mediante a leitura desta definição, parte-se igualmente do princípio de que, por exemplo, um anticorpo (ou parte ou epítopo) que ligue específica ou preferencialmente a um primeiro alvo pode ou não ligar específica ou preferencialmente a um segundo alvo. Como tal, a "ligação específica" ou "ligação

preferencial" não necessita forçosamente (embora possa incluir) da ligação exclusiva. Geralmente, mas não necessariamente, a referência à ligação significa ligação preferencial.

Os termos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" e "proteína" são aqui utilizados alternadamente para fazer referência a polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, compreender aminoácidos modificados e ser interrompido por não-aminoácidos. Os termos abrangem igualmente um polímero de aminoácido modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo, formação de ligações dissulfureto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação, ou qualquer outra manipulação ou modificação, tal como conjugação com um componente de rotulação. Igualmente incluídos na definição estão, por exemplo, os polipéptidos que contêm um ou mais análogos de aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais, etc.), bem como outras modificações conhecidas na técnica. Parte-se do princípio de que, uma vez que os polipéptidos desta invenção se baseiam num anticorpo, os polipéptidos podem ocorrer como cadeias únicas ou cadeias associadas.

O termo "polinucleótido" ou "ácido nucleico", conforme aqui utilizado alternadamente, refere-se a polímeros de nucleótidos de qualquer comprimento e inclui ADN e ARN. Os nucleótidos podem ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados ou bases, e/ou respetivos análogos, ou qualquer substrato que possa ser incorporado num polímero por ADN ou ARN polimerase. Um polinucleótido pode compreender nucleótidos modificados, tais como nucleótidos metilados e respetivos análogos. Se estiver presente, a modificação da estrutura de nucleótidos pode ser transmitida antes ou depois da montagem do polímero. A sequência de nucleótidos pode ser interrompida por componentes não-nucleótidos. Um polinucleótido pode ser

ainda modificado após a polimerização, tal como por conjugação com um componente de rotulação. Outros tipos de modificações incluem, por exemplo, "coberturas", substituição de um ou mais dos nucleótidos que ocorrem naturalmente por um análogo, modificações internucleótido, tais como, por exemplo, as com ligações não carregadas (por ex., metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) e com ligações carregadas (por ex., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), as que contêm partes pendentes, tais como, por exemplo, proteínas (por ex., nucleases, toxinas, anticorpos, péptidos de sinal, poli-L-lisina, etc.), as com intercaladores (por ex., acridina, psoraleno, etc.), as que contêm quelatores (por ex., metais, metais radioativos, boro, metais oxidantes, etc.), as que contêm alquilantes, as com ligações modificadas (por ex., ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), bem como formas não modificadas dos polinucleótidos. Além disso, qualquer um dos grupos hidroxilo habitualmente presentes nos açúcares pode ser substituído, por exemplo, por grupos fosfonato ou grupos fosfato, protegidos por grupos de proteção padrão ou ativados para preparar ligações adicionais a nucleótidos adicionais, ou pode ser conjugado com suportes sólidos. Os terminais OH 5' e 3' podem ser fosforilados ou substituídos por aminas ou partes de grupos de cobertura orgânica de 1 a 20 átomos de carbono. Outros hidroxilos podem ser igualmente derivatizados para grupos de proteção padrão. Os polinucleótidos também podem conter formas análogas de açúcares ribose ou desoxirribose geralmente conhecidas na técnica, incluindo, por exemplo, 2'-O-metil, 2'-O-alil, 2'-fluoro ou 2'-azido-ribose, análogos carbocíclicos de açúcar, açúcares α -anoméricos, açúcares epiméricos, tais como arabinose, xiloses ou lixoses, açúcares piranose, açúcares furanose, sedoheptuloses, análogos acíclicos e análogos nucleosídeos abásicos, tal como metilrribosídeo.

Uma ou mais ligações fosfodiéster podem ser substituídas por grupos de ligação alternativos. Estes grupos de ligação alternativos incluem, mas não se limitam a, formas de realização em que o fosfato é substituído por P(O)S("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO ou CH₂ ("formacetal"), em que cada R ou R' é independentemente H ou alquilo substituído ou não substituído (1-20 C) que contém opcionalmente uma ligação (-O-) éter, arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno ou araldilo. Nem todas as ligações num polinucleótido necessitam de ser idênticas. A descrição anterior aplica-se a todos os polinucleótidos aqui referidos, incluindo ARN e ADN.

Um "região variável" de um anticorpo refere-se à região variável da cadeia leve de anticorpo ou à região variável da cadeia pesada de anticorpo, quer sozinha quer em conjunto. Cada uma das regiões variáveis da cadeia pesada e leve consiste em quatro regiões de estrutura (FR) ligadas por três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) igualmente conhecidas como regiões hipervariáveis. As CDRs em cada cadeia são mantidas juntas e próximas pelas FRs e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação do antigénio de anticorpos. Existem, pelo menos, duas técnicas para determinar CDRs: (1) uma abordagem baseada na variabilidade da sequência de espécies cruzadas (ou seja, Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); e (2) uma abordagem baseada nos estudos cristalográficos de complexos antigénio-anticorpo (Chothia et al. (1989) *Nature* 342:877; Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Conforme aqui utilizado, uma CDR pode referir-se a CDRs definidas por uma das duas abordagens ou por uma combinação de ambas as abordagens.

Um "região constante" de um anticorpo refere-se à

região constante da cadeia leve de anticorpo ou à região constante da cadeia pesada de anticorpo, quer sozinha quer em conjunto.

Conforme aqui utilizado, os termos “fator de crescimento do nervo” e “NGF” referem-se ao fator de crescimento do nervo e variantes do mesmo que mantêm, pelo menos, parte da atividade biológica de NGF. Conforme aqui utilizado, o NGF inclui todas as espécies mamíferas do NGF de sequência nativa, incluindo humana, canina, felina, equina ou bovina.

O “recetor NGF” refere-se a um polipéptido ligado ou ativado por NGF. Os recetores NGF incluem o recetor TrkA e o recetor p75 de qualquer espécie mamífera, incluindo, mas não se limitando a, humana, canina, felina, equina, primata ou bovina.

Conforme aqui utilizado, um “anticorpo antagonista anti-NGF” (alternadamente denominado “anticorpo anti-NGF”) refere-se a um anticorpo que é capaz de ligar ao NGF e inibir a atividade biológica de NGF e/ou as vias a jusante mediadas pela sinalização de NGF. Um anticorpo antagonista anti-NGF abrange anticorpos que bloqueiam, antagonizam, suprimem ou reduzem (incluindo significativamente) a atividade biológica de NGF, incluindo as vias a jusante mediadas pela sinalização de NGF, tais como a ligação de recetor e/ou dedução de uma resposta celular ao NGF. Para efeitos da presente invenção, partir-se-á explicitamente do princípio de que o termo “anticorpo antagonista anti-NGF” abrange todos os termos, títulos e características e estados funcionais identificados anteriormente, de acordo com os quais o próprio NGF, uma atividade biológica de NGF (incluindo, mas sem limitação, a respetiva capacidade de mediar qualquer aspeto da dor pós-cirúrgica) ou as consequências da atividade biológica são substancialmente anulados, diminuídos ou neutralizados de alguma maneira significativa. Em algumas formas de realização, um

anticorpo antagonista anti-NGF liga o NGF e previne a dimerização do NGF e/ou ligação a um recetor NGF (tal como p75 e/ou trkA). Noutras formas de realização, um anticorpo anti-NGF liga o NGF e previne a dimerização do recetor trkA e/ou a autofosforilação de trkA. São aqui fornecidos exemplos de anticorpos antagonistas anti-NGF.

Geralmente, "atividade biológica" de NGF refere-se à capacidade de ligar recetores NGF e/ou ativar vias de sinalização de recetor NGF. Sem limitação, uma atividade biológica inclui uma ou mais das seguintes: a capacidade de ligar um recetor NGF (tal como p75 e/ou trkA); a capacidade de provocar dimerização e/ou autofosforilação do recetor trkA; a capacidade de ativar uma via de sinalização de recetor NGF; a capacidade de provocar diferenciação, proliferação, sobrevivência, crescimento de células e outras alterações na fisiologia da célula, incluindo (no caso dos neurónios, incluindo o neurónio central e periférico) alteração na morfologia neuronal, sinaptogénese, função sináptica, neurotransmissor e/ou libertação de neuropéptidos e regeneração a seguir à lesão; a capacidade de provocar sobrevivência de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho; e a capacidade de mediar a dor, incluindo a dor pós-cirúrgica.

Conforme aqui utilizado, "substancialmente puro" refere-se a material que é, pelo menos, 50% puro (ou seja, sem substâncias contaminadoras), mais preferencialmente, pelo menos, 90% puro, mais preferencialmente, pelo menos, 95% puro, mais preferencialmente, pelo menos, 98% puro, mais preferencialmente, pelo menos, 99% puro.

Uma "célula hospedeira" inclui uma célula individual ou cultura de células que pode ser ou foi um recipiente para vetores para a incorporação de inserções de polinucleótidos. As células hospedeiras incluem a progenitura de uma única célula hospedeira, e a progenitura

não necessita de ser completamente idêntica (na morfologia ou no complemento ADN genómico) à célula principal original devido a mutação natural, accidental ou deliberada. Uma célula hospedeira inclui células transfetadas *in vivo* com polinucleótidos desta invenção.

Conforme aqui utilizado, "tratamento" é uma abordagem para obter resultados clínicos desejados ou benéficos. Para efeitos desta invenção, os resultados clínicos desejados ou benéficos incluem, mas não se limitam a, um ou mais dos seguintes: melhora ou mitigação de qualquer aspeto da dor, incluindo dor aguda, crónica, inflamatória, neuropática, pós-cirúrgica, dor de artrite reumatoide ou dor de osteoartrite. Para efeitos desta invenção, os resultados clínicos desejados ou benéficos incluem, mas não se limitam a, um ou mais dos seguintes: incluindo a diminuição da gravidade, a mitigação de um ou mais sintomas associados à dor, incluindo qualquer aspeto da dor (tal como encurtamento da duração da dor, redução da sensação de dor ou sensibilidade à dor).

Uma "quantidade eficaz" de fármaco, composto ou composição farmacêutica é uma quantidade suficiente para produzir resultados clínicos desejados ou benéficos, incluindo resultados clínicos, tais como mitigação ou redução da sensação de dor. Uma quantidade eficaz pode ser administrada numa ou mais administrações. Para efeitos desta invenção, uma quantidade eficaz de fármaco, composto ou composição farmacêutica é uma quantidade suficiente para tratar, melhorar, reduzir a intensidade e/ou prevenir a dor, incluindo a dor pós-cirúrgica, a dor de artrite reumatoide e/ou a dor de osteoartrite. Em algumas formas de realização, a "quantidade eficaz" pode reduzir a dor em repouso ou a dor induzida mecanicamente (incluindo dor a seguir a movimento), ou ambas, e pode ser administrada antes, durante ou após uma incisão, corte, rutura ou ferimento e/ou antes, durante ou após estímulo doloroso.

Tal como é subentendido no contexto clínico, uma quantidade eficaz de um fármaco, composto ou composição farmacêutica pode ou não ser alcançada em conjunto com outro fármaco, composto ou composição farmacêutica. Deste modo, uma “quantidade eficaz” pode ser considerada no contexto da administração de um ou mais agentes terapêuticos, e pode ser considerado um único agente para ser fornecido numa quantidade eficaz se, em conjunto com um ou mais agentes, puder ser ou for alcançado um resultado desejável.

A “redução da incidência” da dor significa redução da gravidade (que pode incluir a redução da necessidade e/ou quantidade de (por ex. exposição a) outros fármacos e/ou terapias geralmente utilizados para estas condições, incluindo, por exemplo, opiáceos), duração e/ou frequência (incluindo, por exemplo, adiamento ou aumento do tempo para a dor pós-cirúrgica num indivíduo). Tal como é interpretado pelos peritos na técnica, os indivíduos podem variar em termos da respetiva resposta ao tratamento e, como tal, por exemplo um “método de redução da incidência da dor de artrite reumatoide ou dor de osteoartrite num indivíduo” retrata a administração do anticorpo antagonista anti-NGF com base numa expectativa razoável de que essa administração pode causar provavelmente uma redução na incidência nesse indivíduo específico.

O “melhoramento” de uma dor ou de um ou mais sintomas de uma dor (tal como dor de artrite reumatoide ou dor de osteoartrite) significa uma diminuição ou melhora de um ou mais sintomas de uma dor em comparação com a não-administração de um anticorpo antagonista anti-NGF. O “melhoramento” inclui igualmente o encurtamento ou redução da duração de um sintoma.

A “atenuação” de uma dor ou de um ou mais sintomas de uma dor (tal como dor de artrite reumatoide ou dor de osteoartrite) significa a diminuição da extensão de uma ou mais manifestações clínicas indesejáveis da dor pós-

cirúrgica num indivíduo ou população de indivíduos tratados com um anticorpo antagonista anti-NGF de acordo com a invenção.

Conforme aqui utilizado, o "adiamento" do desenvolvimento da dor significa diferir, atrasar, abrandar, retardar, estabilizar e/ou demorar a progressão da dor, tal como a dor pós-cirúrgica, dor de artrite reumatoide ou dor de osteoartrite. Este adiamento pode ser de durações variáveis de tempo, dependendo do historial da doença e/ou dos indivíduos que estão a ser tratados. Tal como é evidente para um perito na técnica, um adiamento suficiente ou significativo pode efetivamente abranger a prevenção, de modo a que o indivíduo não desenvolva dor. Um método que "adie" o desenvolvimento do sintoma é um método que reduz a probabilidade de desenvolvimento do sintoma num determinado período de tempo e/ou reduz a extensão dos sintomas num determinado período de tempo, em comparação com a não-utilização do método. Normalmente, essas comparações são baseadas em estudos clínicos, utilizando um número estatisticamente significativo de pessoas.

Conforme aqui utilizado, "dor" refere-se à dor de qualquer etiologia, incluindo dor aguda e crónica, e qualquer dor com um componente inflamatório. Os exemplos de dor incluem dor pós-cirúrgica, dor pós-operatória (incluindo dor dentária), enxaqueca, dor de cabeça e nevralgia do trigémio, dor associada a queimadura, ferida ou pedra no rim, dor associada a traumatismo (incluindo ferimento traumático na cabeça), dor neuropática, dor associada a distúrbios músculo-esqueléticos, tais como artrite reumatoide, osteoartrite, espondilite anquilosante, artropatias seronegativas (não reumatoides), reumatismo não articular e distúrbios periarticulares, e dor associada a cancro (incluindo "dor transitória" e dor associada a cancro terminal), neuropatia periférica e nevralgia pós-herpética. Os exemplos de dor com um componente

inflamatório (além de alguns dos descritos acima) incluem dor reumática, dor associada a mucosite e dismenorreia.

A "dor pós-cirúrgica" (alternadamente denominada "pós-incisional" ou "dor pós-traumática") refere-se à dor que surge ou resulta de um traumatismo externo, tal como um corte, perfuração, incisão, rutura ou ferida no tecido de um indivíduo (incluindo a que surge a partir de todos os procedimentos cirúrgicos, quer invasivos quer não invasivos). Conforme aqui utilizado, a dor pós-cirúrgica não inclui a dor que ocorre (surge ou é originada) sem um traumatismo físico externo. Em algumas formas de realização, a dor pós-cirúrgica é uma dor interna ou externa (incluindo periférica), e a ferida, o corte, o traumatismo, a rutura ou a incisão podem ocorrer de forma accidental (tal como com uma ferida traumática) ou deliberada (tal como com uma incisão cirúrgica). Conforme aqui utilizado, "dor" inclui nociceção e a sensação de dor, e a dor pode ser estimada objetiva e subjetivamente, utilizando classificações da dor e outros métodos bem conhecidos na técnica. A dor pós-cirúrgica, conforme aqui utilizado, inclui alodinia (ou seja, maior resposta a um estímulo normalmente não nocivo) e hiperalgesia (ou seja, maior resposta a um estímulo normalmente nocivo ou desagradável), que pode, por conseguinte, ser de natureza térmica ou mecânica (tátil). Em algumas formas de realização, a dor caracteriza-se por sensibilidade térmica, sensibilidade mecânica e/ou dor em repouso. Em algumas formas de realização, a dor pós-cirúrgica compreende dor induzida mecanicamente ou dor em repouso. Noutras formas de realização, a dor pós-cirúrgica compreende dor em repouso. A dor pode ser uma dor primária ou secundária, tal como é bem conhecido na técnica.

Uma "amostra biológica" abrange uma variedade de tipos de amostra obtidos a partir de um indivíduo e pode ser utilizada num ensaio de diagnóstico ou de monitorização. A

definição abrange amostras de sangue e outros líquidos de origem biológica, amostras de tecido sólido, tais como um espécime de biópsia ou culturas de tecido ou células derivadas das mesmas, e a respetiva progenitura. A definição inclui igualmente amostras que foram manipuladas de algum modo após a respetiva aquisição, tal como através de tratamento com reagentes, solubilização ou enriquecimento para determinados componentes, tais como proteínas ou polinucleótidos, ou incorporação numa matriz semissólida ou sólida para efeitos de seccionamento. O termo "amostra biológica" abrange uma amostra clínica e inclui igualmente amostras de células na cultura, sobrenadantes de células, lisados de células, soro, plasma, fluido biológico e tecido.

Um "indivíduo" é um vertebrado, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um ser humano. Os mamíferos incluem, mas não se limitam a, animais de criação (tais como vacas), animais de desporto, animais de estimação (tais como gatos, cães e cavalos), primatas, ratinhos e ratos.

Conforme aqui utilizado, "vetor" significa uma construção, que é capaz de fornecer, e preferencialmente expressar, um ou mais genes ou sequências de interesse numa célula hospedeira. Os exemplos de vetores incluem, mas não se limitam a, vetores virais, vetores de expressão de ARN e ADN nu, vetores de plasmídeos, cosmídeos ou bacteriófagos, vetores de expressão de ARN e ADN associados a agentes de condensação catiónicos, vetores de expressão de ARN e ADN encapsulados em lipossomas, e determinadas células eucarióticas, tais como células produtoras.

Conforme aqui utilizado, "sequência de controlos de expressão" significa uma sequência de ácidos nucleicos que direciona a transcrição de um ácido nucleico. Uma sequência de controlos de expressão pode ser um promotor, tal como um promotor constitutivo ou induzido, ou um intensificador. A

sequência de controlos de expressão é ligada de modo funcional à sequência de ácidos nucleicos a ser transcrita.

Conforme aqui utilizado, "portador farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer material que, quando combinado com um ingrediente ativo, permite que o ingrediente mantenha a atividade biológica e não seja reativo com o sistema imunitário da pessoa. Os exemplos incluem, mas não se limitam a, qualquer um dos portadores farmacêuticos padrão, tais como uma solução salina tamponada com fosfato, água, emulsões, tais como emulsão de óleo/água e vários tipos de agentes de humedecimento. Os diluentes preferidos para administração parentérica ou de aerossol são a salina tamponada com fosfato ou a salina normal (0,9%). As composições que compreendem esses portadores são formuladas através de métodos convencionais bem conhecidos (consulte, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a edição, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; e *Remington, The Science and Practice of Pharmacy* 20^a Ed. Mack Publishing, 2000).

O termo " K_{off} ", conforme aqui utilizado, pretende referir-se à constante de taxa off para a dissociação de um anticorpo do complexo anticorpo/antigénio.

O termo " K_D ", conforme aqui utilizado, pretende referir-se à constante de dissociação de uma interação anticorpo-antigénio.

ANTICORPO E3, E3 - ANTICORPOS DERIVADOS, COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO

Composições E3, Composições Derivadas E3 e Métodos de Criação de Composições

Esta invenção abrange composições, incluindo composições farmacêuticas, que compreendem um polipéptido ou anticorpo E3; e polinucleótidos que compreendem sequências que codificam um polipéptido ou anticorpo E3. Conforme aqui utilizado, as composições compreendem um ou mais anticorpos ou polipéptidos (que podem ou não ser um

anticorpo) que ligam ao NGF, e/ou um ou mais polinucleótidos que compreendem sequências que codificam um ou mais anticorpos ou polipéptidos que ligam ao NGF. Estas composições podem ainda compreender excipientes adequados, tais como excipientes farmacologicamente aceitáveis, incluindo tampões, que são bem conhecidos na técnica.

A invenção abrange igualmente formas de realização de anticorpo, polipéptido e polinucleótido isolados. A invenção abrange igualmente formas de realização de anticorpo, polipéptido e polinucleótido substancialmente puros.

Os anticorpos e polipéptidos da invenção caracterizam-se por qualquer (uma ou mais) das seguintes características: (a) capacidade de ligar ao NGF; (b) capacidade de reduzir e/ou inibir a atividade biológica de NGF e/ou vias a jusante mediadas pela sinalização de NGF; (c) capacidade de reduzir e/ou inibir a sobrevivência dependente de NGF de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho; (d) ausência de qualquer reatividade cruzada significativa de NT3, NT4/5 e/ou BDNF; (e) capacidade de tratar e/ou prevenir dor (incluindo dor pós-cirúrgica); (f) capacidade de aumentar o espaço livre do NGF; (g) capacidade de reduzir ou inibir a ativação do recetor trkA, conforme detetado, por exemplo, utilizando o ensaio de ativação de recetor quinase (KIRA) (consulte a Patente U.S. 6.027.927).

As propriedades de ligação do anticorpo E3, que ligam o NGF humano com alta afinidade e cinética de dissociação lenta, em comparação com o anticorpo monoclonal anti-NGF murino precursor 911, são resumidas abaixo. O E3 liga o NGF humano com uma afinidade de ligação de aproximadamente 50 dobras a mais do que anticorpo de ratinho precursor 911.

anticorpo	K_D	K_{off}	K_{on}
911 (Fab)	3,7 nM	$9 \times 10^{-5} s^{-1}$	$2,2 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$
E3 (Fab)	0,07 nM	$< 4 \times 10^{-5} s^{-1}$	$6 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$

O anticorpo E3 e anticorpos relacionados mostram igualmente uma forte capacidade para antagonizar o NGF humano, conforme estimado pelos ensaios *in vitro* (consulte os Exemplos 2 e 3). Por exemplo, o anticorpo E3 antagoniza a sobrevivência dependente de NGF de neurónios trigeminais E13 de ratinho num IC50 de cerca de 21 pM na presença de 15 pM de NGF humano, e de cerca de 1,2 pM na presença de 1,5 pM de NGF humano.

Por conseguinte, noutro aspeto, os anticorpos e os polipéptidos da invenção identificam-se e caracterizam-se ainda por: (h) ligação de alta afinidade ao NGF humano com baixa cinética de dissociação (em algumas formas de realização, com uma K_D de menos de cerca de 2 nM, e/ou uma K_{off} mais lenta do que cerca de $6 \times 10^{-5} s^{-1}$) e/ou (i) capacidade de inibir (bloquear) a sobrevivência dependente de NGF de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 de cerca de 100 pM ou menos em cerca de 15 pM de NGF (em algumas formas de realização, NGF humano) e/ou um IC50 de cerca de 20 pM ou menos em cerca de 1,5 pM de NGF.

Em algumas formas de realização, o anticorpo liga o NGF humano, e não liga significativamente um NGF de outra espécie vertebrada (em algumas formas de realização, mamífera). Em algumas formas de realização, o anticorpo liga o NGF humano, bem como um ou mais NGF de outra espécie vertebrada (em algumas formas de realização, mamífera). Noutras formas de realização ainda, o anticorpo liga o NGF e não reage significativamente de forma cruzada com outras neurotrofinas (tais como as neurotrofinas relacionadas, NT3, NT4/5 e/ou BDNF). Em algumas formas de realização, o anticorpo liga o NGF, bem como, pelo menos, uma outra

neurotrofina. Em algumas formas de realização, o anticorpo liga a uma espécie mamífera de NGF, tal como um cavalo ou um cão, mas não liga significativamente ao NGF de outra espécie mamífera.

Em algumas formas de realização, a invenção corresponde a um anticorpo que compreende uma cadeia leve que é codificada por um polinucleótido produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4893 ou ATCC N.º PTA-4894. Noutro aspeto, a invenção corresponde a um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleótido produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895. A presente invenção abrange igualmente várias formulações de E3 e fragmentos de anticorpo equivalente (por ex. Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), cadeia única (ScFv), mutantes do mesmo, proteínas de fusão que compreendem uma porção de anticorpo, e qualquer outra configuração modificada de E3 que compreenda um local de reconhecimento do antigénio (NGF) da especificidade requerida. Os anticorpos equivalentes de E3, incluindo fragmentos de anticorpo e polipéptido (que podem ou não ser anticorpos) de E3, e os polipéptidos que compreendem fragmentos de polipéptido de E3 identificam-se e caracterizam-se por qualquer (um ou mais) dos critérios descritos acima.

Num aspeto, a invenção fornece um anticorpo antifator de crescimento do nervo (NGF) ou fragmento do mesmo, que compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende:

(i) uma região CDR1 de SEQ. ID N.º 3;
(ii) uma região CDR2 de SEQ. ID N.º 4;
(iii) uma região CDR3 selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ. ID N.ºs 5, 58 e 60; e

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende:

(i) uma região CDR1 de SEQ. ID N.º 6;
(ii) uma região CDR2 de SEQ. ID N.º 7;
(iii) uma região CDR3 selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ. ID N.ºs 8, 57, 59 e 61;
em que o anticorpo ou fragmento do mesmo liga o NGF humano com uma K_D de 2nM ou menos.

A invenção fornece qualquer um dos seguintes, ou composições (incluindo composições farmacêuticas) que compreendem qualquer um dos seguintes: (a) anticorpo E3; (b) um fragmento ou uma região do anticorpo E3; (c) uma cadeia leve do anticorpo E3 conforme ilustrado na Figura 1B; (c) uma cadeia pesada do anticorpo E3 conforme ilustrado na Figura 1A; (d) uma ou mais regiões variáveis de uma cadeia leve e/ou de uma cadeia pesada do anticorpo E3; (e) uma ou mais CDRs (uma, duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs) do anticorpo E3 ilustradas nas Figuras 1A e 1B; (f) CDR H3 da cadeia pesada do anticorpo E3 ilustrada na Figure 1A; (g) CDR L3 da cadeia leve do anticorpo E3 ilustrada na Figura 1B; (h) três CDRs da cadeia leve do anticorpo E3 ilustradas na Figura 1B; (i) três CDRs da cadeia pesada do anticorpo E3 ilustradas na Figura 1A; (j) três CDRs da cadeia leve e três CDRs da cadeia pesada do anticorpo E3 ilustradas nas Figuras 1A e 1B; e (k) um anticorpo que compreende qualquer um de (b) a (j). Tal como é evidente a partir da descrição aqui apresentada, são especificamente excluídas da invenção as formas de realização de polipéptidos que consistem na sequência de aminoácidos idêntica para uma sequência de aminoácidos de anticorpo monoclonal de ratinho, 911. As sequências CDR alargadas de Mab 911 são ilustradas nas Figuras 1A e 1B e nas SEQ. ID N.ºs 9 a 14.

As porções de CDR do anticorpo E3 (incluindo CDRs de Chothia e de Kabat) são representadas esquematicamente nas Figuras 1A e 1B e consistem nas seguintes sequências de aminoácidos: (a) cadeia pesada CDR 1 ("CDR H1") GFSLIGYDLN

(SEQ. ID N.º 3); (b) cadeia pesada CDR 2 ("CDR H2") IIWGDGTTDYN SAVKS (SEQ. ID N. 4); (c) cadeia pesada CDR 3 ("CDR H3") GGYWYATSYYFDY (SEQ. ID N.º 5); (d) cadeia leve CDR 1 ("CDR L1") RASQSI SNNLN (SEQ. ID N.º 6); (e) cadeia leve CDR 2 ("CDR L2") YTSRFHS (SEQ. ID N.º 7); e (f) cadeia leve CDR 3 ("CDR L3") QQEHTLPYT (SEQ. ID N.º 8). A determinação das regiões CDR faz parte do âmbito da técnica. Parte-se do princípio de que, em algumas formas de realização, as CDRs podem ser uma combinação da CDR de Kabat e de Chothia (igualmente denominadas "CDRs combinadas" ou "CDRs alargadas"). Em algumas formas de realização, as CDRs compreendem a CDR de Kabat. Noutras formas de realização, as CDRs correspondem à CDR de Chothia.

Em algumas formas de realização, a invenção fornece um anticorpo que compreende, pelo menos, uma CDR substancialmente homóloga a pelo menos uma CDR, pelo menos duas, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco CDRs de E3 (ou, em algumas formas de realização, substancialmente homóloga a todas as 6 CDRs de E3, ou derivada do E3). Outras formas de realização incluem anticorpos que têm, pelo menos, duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs substancialmente homólogas a, pelo menos, duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs de E3 ou derivadas do E3. Parte-se do princípio de que, para efeitos desta invenção, a especificidade de ligação e/ou a atividade global (que pode ser em termos de tratamento e/ou prevenção da dor ou inibição da sobrevivência dependente de NGF de neurónios trigeminais de ratinho E13.5) são geralmente mantidas, embora a extensão da atividade possa variar em comparação com o E3 (pode ser maior ou menor).

A invenção fornece igualmente um polipéptido (que pode ou não ser um anticorpo) que compreende uma sequência de aminoácidos de E3 (ilustrado nas Figuras 1A e 1B) que tem qualquer um dos seguintes: pelo menos 5 aminoácidos

contíguos, pelo menos 8 aminoácidos contíguos, pelo menos 10 aminoácidos contíguos, pelo menos 15 aminoácidos contíguos, pelo menos 20 aminoácidos contíguos, pelo menos 25 aminoácidos contíguos, pelo menos 30 aminoácidos contíguos de uma sequência de E3, em que pelo menos 3 dos aminoácidos são de uma região variável de E3, com o conhecimento de que as formas de realização que consistem na sequência de aminoácidos idêntica para uma sequência de aminoácidos de anticorpo monoclonal de ratinho, 911, são especificamente excluídas. As sequências de CDR alargadas de Mab 911 são ilustradas nas Figuras 1A e 1B, e nas SEQ. ID N.ºs 9 a 14. Numa forma de realização, a região variável é de uma cadeia leve de E3. Noutra forma de realização, a região variável é de uma cadeia pesada de E3. Noutra forma de realização, os 5 (ou mais) aminoácidos contíguos são de uma região determinante de complementaridade (CDR) de E3 ilustrada nas Figuras 1A e 1B.

Noutra forma de realização, a invenção fornece um polipéptido que compreende uma sequência de aminoácidos de E3 que tem qualquer um dos seguintes: pelo menos 5 aminoácidos contíguos, pelo menos 8 aminoácidos contíguos, pelo menos cerca de 10 aminoácidos contíguos, pelo menos cerca de 15 aminoácidos contíguos, pelo menos cerca de 20 aminoácidos contíguos, pelo menos cerca de 25 aminoácidos contíguos, pelo menos cerca de 30 aminoácidos contíguos de uma sequência de E3, em que a sequência de E3 compreende qualquer um ou mais dos seguintes: resíduo de aminoácido L29 de CDRH1, I50 de CDRH2, W101 de CDRH3 e/ou A103 de CDRH3; e/ou resíduo de aminoácido S28 de CDRL1, N32 de CDRL1, T51 de CDRL2, 91E de CDRL3 e/ou H92 de CDRL3, com o conhecimento de que as formas de realização que consistem na sequência de aminoácidos idêntica para uma sequência de aminoácidos de anticorpo monoclonal de ratinho, 911, são especificamente excluídas.

Tal como é evidente, em toda esta divulgação, é

utilizado um esquema de numeração de aminoácidos sequencial para fazer referência a resíduos de aminoácidos nas regiões variáveis (ou seja, os resíduos de aminoácidos em cada região variável são numerados por ordem). Tal como é bem conhecido na técnica, os sistemas de numeração de Kabat e/ou Chothia são úteis ao comparar dois anticorpos ou polipéptidos, tal como um anticorpo E3 e uma variante E3 (ou polipéptido suspeito de ser uma variante E3). É bem conhecida na técnica a forma como converter a numeração sequencial em numeração de Chothia e/ou Kabat, se desejado, por exemplo, para utilização na criação de comparações entre E3 e outro polipéptido. A Figura 23 representa as regiões variáveis E3 numeradas utilizando a numeração de Chothia e Kabat sequencial. Além disso, para facilitar a comparação, habitualmente parte-se do princípio de que os resíduos de constituição têm, de um modo geral, mas nem sempre, aproximadamente o mesmo número de resíduos. Contudo, as CDRs podem variar em tamanho (ou seja, é possível ter inserções e/ou deleções de um ou mais resíduos de aminoácidos). Ao comparar um anticorpo E3 e uma variante E3 candidata (por exemplo, no caso de uma região CDR de uma sequência candidata que é maior na sequência no anticorpo E3 com o qual está alinhado), devem ser seguidas as etapas seguintes (embora sejam conhecidos na técnica outros métodos). A sequência de anticorpos candidata está alinhada com as regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve do anticorpo E3. O alinhamento pode ser efetuado manualmente ou por computador utilizando programas informáticos geralmente aceites. O alinhamento pode ser facilitado utilizando alguns resíduos de aminoácidos comuns à maioria das sequências Fab. Por exemplo, as cadeias leves e pesadas têm normalmente duas cisteínas, que se encontram frequentemente numa posição conservada. Parte-se do princípio de que a sequência de aminoácidos de um anticorpo de variante candidata pode ser maior (ou seja, ter resíduos

de aminoácidos inseridos) ou menor (ter resíduos de aminoácidos eliminados). É possível adicionar sufixos ao número do resíduo para indicar a inserção de resíduos adicionais, por ex. resíduo 34 abc. Relativamente a sequências candidatas que, por exemplo, estejam alinhadas com uma sequência E3 para, por exemplo, os resíduos 33 e 35, mas não têm nenhum resíduo entre elas para alinhar com o resíduo 35, o resíduo 35 simplesmente não é atribuído a nenhum resíduo. Noutra abordagem, é geralmente bem notório que é possível efetuar a comparação entre aminoácidos de estrutura equivalente (por ex. a mesma posição no complexo antigénio-anticorpo) ao comparar CDRs de comprimentos diferentes. Por exemplo, a numeração de Chothia (Al-Lazikani et al, supra) coloca geralmente (mas não em todos os casos) inserções e deleções nas posições estruturalmente corretas. A equivalência estrutural também pode ser deduzida ou demonstrada utilizando cristalografia de raios X ou análise de ciclo de duplo mutante (consulte Pons et al. (1999) *Prot. Sci.* 8:958-968).

A afinidade de ligação de um anticorpo anti-NGF ao NGF (tal como NGFh) pode ser de cerca de 0,10 a cerca de 0,80 nM, cerca de 0,15 a cerca de 0,75 nM e cerca de 0,18 a cerca de 0,72 nM. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é de cerca de 2 pM, cerca de 5 pM, cerca de 10 pM, cerca de 15 pM, cerca de 20 pM, cerca de 40 pM ou maior do que cerca de 40 pM. Numa forma de realização, a afinidade de ligação é entre cerca de 2 pM e 22 pM. Noutras formas de realização, a afinidade de ligação é menos do que cerca de 2 nM, cerca de 1,5 nM, cerca de 1 nM, cerca de 900 pM, cerca de 800 pM, cerca de 700 pM, cerca de 600 pM, cerca de 500 pM, cerca de 400 pM, cerca de 300 pM, cerca de 200 pM, cerca de 150 pM, cerca de 100 pM, cerca de 90 pM, cerca de 80 pM, cerca de 70 pM, cerca de 60 pM, cerca de 50 pM, cerca de 40 pM, cerca de 30 pM, cerca de 10 pM. Noutras formas de realização, a afinidade de

ligação é de cerca de 0,1 nM ou cerca de 0,07 nM. Noutras formas de realização, a afinidade de ligação é menos do que cerca de 0,1 nM ou menos do que cerca de 0,07 nM. Noutras formas de realização, a afinidade de ligação é qualquer valor de cerca de 2 nM, cerca de 1,5 nM, cerca de 1 nM, cerca de 900 pM, cerca de 800 pM, cerca de 700 pM, cerca de 600 pM, cerca de 500 pM, cerca de 400 pM, cerca de 300 pM, cerca de 200 pM, cerca de 150 pM, cerca de 100 pM, cerca de 90 pM, cerca de 80 pM, cerca de 70 pM, cerca de 60 pM, cerca de 50 pM, cerca de 40 pM, cerca de 30 pM, cerca de 10 pM a qualquer valor de cerca de 2 pM, cerca de 5 pM, cerca de 10 pM, cerca de 15 pM, cerca de 20 pM ou cerca de 40 pM. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é qualquer valor de cerca de 2 nM, cerca de 1,5 nM, cerca de 1 nM, cerca de 900 pM, cerca de 800 pM, cerca de 700 pM, cerca de 600 pM, cerca de 500 pM, cerca de 400 pM, cerca de 300 pM, cerca de 200 pM, cerca de 150 pM, cerca de 100 pM, cerca de 90 pM, cerca de 80 pM, cerca de 70 pM, cerca de 60 pM, cerca de 50 pM, cerca de 40 pM, cerca de 30 pM, cerca de 10 pM. Noutras formas de realização ainda, a afinidade de ligação é de cerca de 2 pM, cerca de 5 pM, cerca de 10 pM, cerca de 15 pM, cerca de 20 pM, cerca de 40 pM ou maior do que cerca de 40 pM.

A afinidade de ligação do anticorpo ao NGF pode ser determinada utilizando os métodos bem conhecidos na técnica. Uma forma de determinar a afinidade de ligação de anticorpos ao NGF é medindo a afinidade de fragmentos Fab monofuncionais do anticorpo, conforme descrito nos Exemplos. Para obter fragmentos Fab monofuncionais, um anticorpo (por exemplo, IgG) pode ser clivado com papaína ou expressado de forma recombinante. A afinidade de um fragmento Fab anti-NGF de um anticorpo pode ser determinada pela ressonância de plasma de superfície (sistema de ressonância de plasma de superfície (SPR) BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ), conforme descrito nos Exemplos.

Este protocolo é adequado para utilização na determinação da afinidade de ligação de um anticorpo ao NGF de qualquer espécie, incluindo NGF humano, NGF de outro vertebrado (em algumas formas de realização, mamífero) (tal como NGF de ratinho, NGF de rato, NGF de primata), bem como para utilização com outras neurotrofinas, tais como as neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5 e/ou BDNF.

Em algumas formas de realização, os anticorpos ou péptidos da invenção podem inibir (reduzir e/ou bloquear) a sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer valor de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM ou menos. Em algumas formas de realização, os anticorpos ou péptidos da invenção podem inibir (reduzir e/ou bloquear) a sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 (na presença de cerca de 1,5 pM de NGF) de cerca de qualquer valor de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM ou menos. Em algumas formas de realização, os anticorpos ou péptidos da invenção podem inibir (reduzir e/ou bloquear) a sobrevivência dependente de NGF de rato de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer valor de 150 pM, 125 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM ou menos. Em algumas formas de realização, os anticorpos ou péptidos da invenção podem inibir (reduzir e/ou bloquear) a sobrevivência dependente de NGF de rato de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com um IC50 (na presença de cerca de 1,5 pM de NGF) de cerca de qualquer valor de 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM ou menos. Os métodos de medição da sobrevivência dependente de NGF de neurónios trigeminais E13 de ratinho são conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, no Exemplo 2.

A invenção fornece igualmente métodos de criação de qualquer um destes anticorpos ou polipéptidos. Os anticorpos desta invenção podem ser criados através de procedimentos conhecidos na técnica, e alguns dos quais são ilustrados nos Exemplos. Os polipéptidos podem ser produzidos por proteólise ou outra degradação dos anticorpos, através de métodos recombinantes (ou seja, polipéptidos individuais ou de fusão), conforme descrito acima, ou por síntese química. Os polipéptidos dos anticorpos, especialmente os polipéptidos mais pequenos até cerca de 50 aminoácidos, são criados convenientemente por síntese química. Os métodos de síntese química são conhecidos na técnica e estão disponíveis comercialmente. Por exemplo, um anticorpo E3 pode ser produzido por um sintetizador de polipéptidos automatizado que utilize o método de fase sólida. Consulte igualmente as Patentes U.S. 5.807.715; 4.816.567; e 6.331.415. Os anticorpos quiméricos ou híbridos podem ser igualmente preparados *in vitro* utilizando métodos conhecidos de composição química de proteínas sintéticas, incluindo o que envolvem agentes de reticulação. Por exemplo, as imunotoxinas podem ser construídas utilizando uma reação de troca de dissulfuretos ou mediante formação de uma ligação tioéter. Os exemplos de reagentes adequados para este fim incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato.

Noutra alternativa, os anticorpos podem ser criados de forma recombinante utilizando procedimentos que são bem conhecidos na técnica. Numa forma de realização, um polinucleótido que compreende uma sequência que codifica as regiões de cadeia leve e variáveis do anticorpo E3 (ilustrado nas Figuras 1A e 1B) é clonado num vetor para expressão ou propagação numa célula hospedeira (por ex, células CHO). Noutra forma de realização, as sequências de polinucleótidos ilustradas nas Figuras 2 e 3 são clonadas num ou mais vetores para expressão ou propagação. A

sequência que codifica o anticorpo de interesse pode ser mantida num vetor numa célula hospedeira e a célula hospedeira pode ser então expandida e congelada para utilização futura. Os vetores (incluindo os vetores de expressão) e as células hospedeiras são aqui descritos mais adiante. Os métodos de expressão de anticorpos de forma recombinante em plantas ou leite foram divulgados. Consulte, por exemplo, Peeters et al. (2001) *Vaccine* 19:2756; Lonberg, N. e D. Huszar (1995) *Int.Rev.Immunol* 13:65; e Pollock et al. (1999) *J Immunol Methods* 231:147. Os métodos de criação de derivados de anticorpos, por exemplo humanizados, cadeia única, etc. são conhecidos na técnica.

A invenção abrange igualmente fragmentos de região variável de cadeia única ("scFv") de anticorpos desta invenção, tal como as E3. Os fragmentos de região variável de cadeia única são criados mediante ligação de regiões variáveis de cadeia leve e/ou pesada utilizando um péptido de ligação pequeno. Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426. Um exemplo de um péptido de ligação é (GGGGS)₃ (SEQ. ID N.º 15), que liga aproximadamente 3,5 nm entre o carboxi-terminal de uma região variável e o amino-terminal da outra região variável. Os ligantes de outras sequências foram concebidos e utilizados (Bird et al. (1988)). Como consequência, os ligantes podem ser modificados para funções adicionais, tais como ligação de fármacos ou ligação a suportes sólidos. As variantes de cadeia única podem ser produzidas quer de forma recombinante quer de forma sintética. Para a produção sintética de scFv, pode ser utilizado um sintetizador automatizado. Para a produção recombinante de scFv, pode ser introduzido um plasmídeo adequado contendo o polinucleótido que codifica o scFv numa célula hospedeira adequada, quer eucariótica, tais como células de levedura, planta, inseto ou mamífero, quer procarióticas, tal como E. coli. Os polinucleótidos que

codificam o scFv de interesse podem ser criados por manipulações de rotina, tal como ligação de polinucleótidos. O scFv resultante pode ser isolado utilizando técnicas de purificação de proteínas padrão conhecidas na técnica.

Outras formas de anticorpos de cadeia única, tais como diacorpos, também são abrangidas. Os diacorpos são anticorpos bivalentes e biespecíficos, nos quais os domínios VH e VL são expressados numa cadeia única de polipéptidos, mas que utilizam um ligante que é demasiado pequeno para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, forçando assim os domínios a emparelharem-se com os domínios complementares de outra cadeia e criando dois locais de ligação do antigénio (consulte e.g., Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123).

O anticorpo pode ser um anticorpo biespecífico, um anticorpo monoclonal com especificidades de ligação para, pelo menos, dois antigénios diferentes. Um anticorpo biespecífico pode ser preparado utilizando os anticorpos aqui divulgados. Os métodos para criar anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica (consulte, e.g., Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymology* 121:210). Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos baseava-se na coexpressão de dois pares de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina, com as duas cadeias pesadas contendo especificidades diferentes (Millstein e Cuello, 1983, *Nature* 305, 537-539).

De acordo com uma abordagem para criar anticorpos biespecíficos, os domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação anticorpo-antigénio) são fundidos com sequências de domínios constantes de imunoglobulina. Preferencialmente, a fusão é com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões

de charneira, CH2 e CH3. É preferível ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1), que contém o local necessário para a ligação da cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. Os ADNs que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados e cotransfetados num organismo hospedeiro adequado. Isto fornece uma grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos de polipéptido nas formas de realização em que relações desiguais das três cadeias de polipéptidos utilizadas na construção fornecem as produções ótimas. Contudo, é possível inserir as sequências de codificação para duas ou para as três cadeias de polipéptidos num vetor de expressão quando a expressão de, pelo menos, duas cadeias de polipéptidos em relações iguais resulta em produções elevadas ou quando as relações não têm nenhum significado especial.

Numa abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos por uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação num braço, e um par de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina híbrida (fornecendo uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Esta estrutura assimétrica, com uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas uma metade da molécula biespecífica, facilita a separação do composto biespecífico desejado de combinações de cadeia de imunoglobulina indesejadas. Esta abordagem é descrita na Publicação PCT n.º WO 94/04690, publicada a 3 de março de 1994.

Os anticorpos heteroconjugados, que compreendem dois anticorpos unidos de forma covalente, também estão no âmbito da invenção. Esses anticorpos foram utilizados para direcionar células do sistema imunitário para células indesejadas (Patente U.S. 4.676.980), e para o tratamento da infeção VIH (Publicações de pedido de patente PCT n.ºs

WO 91/00360 e WO 92/200373; EP 03089). Os anticorpos heteroconjugados podem ser criados utilizando qualquer um dos métodos de reticulação convenientes. As técnicas e os agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na técnica, e são descritos na Patente U.S. 4.676.980.

O anticorpo pode ser um anticorpo humanizado, por exemplo, conforme conhecido na técnica e conforme aqui descrito.

Os anticorpos podem ser modificados conforme descrito na Publicação PCT n.º WO 99/58572, publicada a 18 de novembro de 1999. Estes anticorpos compreendem, além de um domínio de ligação direcionado para a molécula-alvo, um domínio efetor que contém uma sequência de aminoácidos substancialmente homóloga a todo ou parte de um domínio constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina humana. Estes anticorpos são capazes de ligar a molécula-alvo sem acionar uma lise dependente do complemento significativa, ou a destruição mediada por células do alvo. Preferencialmente, o domínio efetor é capaz de ligar especificamente FcRn e/ou FcFcyRIIb. Normalmente, estes baseiam-se nos domínios quiméricos derivados de um ou mais domínios CH2 de cadeia pesada de imunoglobulina humana. Os anticorpos modificados deste modo são preferidos para a utilização na terapia de anticorpo crônica, para evitar reações inflamatórias e outras reações adversas à terapia de anticorpo convencional.

A invenção abrange modificações ao anticorpo E3, incluindo anticorpos funcionalmente equivalentes que não afetam significativamente as respectivas propriedades e variantes que têm atividade melhorada ou diminuída. A modificação de polipéptidos é uma prática de rotina na técnica e é ainda exemplificada nos Exemplos. Os exemplos de polipéptidos modificados incluem polipéptidos com substituições (incluindo substituições conservadoras) de resíduos de aminoácidos, uma ou mais deleções ou adições de

aminoácidos que não alteram significativa e deleterianamente a atividade funcional, ou utilizam análogos químicos.

Uma "variante" de polipéptido, conforme aqui utilizado, é um polipéptido que difere de uma proteína nativa numa ou mais substituições, deleções, adições e/ou inserções, de modo a que a imunorreatividade do polipéptido não seja substancialmente diminuída. Por outras palavras, a capacidade de uma variante de ligar especificamente o antigénio pode ser melhorada ou inalterada, em relação à proteína nativa, ou pode ser diminuída em menos de 50%, e preferencialmente menos de 20%, em relação à proteína nativa. As variantes de polipéptido mostram preferencialmente, pelo menos, cerca de 80%, mais preferencialmente, pelo menos, cerca de 90% e mais preferencialmente, pelo menos, cerca de 95% de identidade (determinada conforme aqui descrito) para os polipéptidos identificados.

As variantes da sequência de aminoácidos dos anticorpos podem ser preparadas mediante a introdução de alterações de nucleótidos apropriadas no ADN do anticorpo, ou por síntese de péptidos. Essas variantes incluem, por exemplo, deleções de, e/ou inserções em, e/ou substituições de resíduos nas sequências de aminoácidos da SEQ. ID N.º 1 ou 2 aqui descrita. Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição é efetuada para chegar à construção final, desde que a construção final tenha as características desejadas. As alterações de aminoácidos também podem alterar os processos pós-tradução do anticorpo, tal como alterar o número ou a posição dos locais de glicosilação.

Um método útil para a identificação de determinados resíduos ou regiões do anticorpo que são localizações preferidas para mutagénese ou modificação chama-se "mutagénese de varrimento por alaninas", e é descrito por Cunningham e Wells, 1989, *Science*, 244:1081-1085. Um

resíduo ou grupo de resíduos-alvo é identificado (por ex. resíduos carregados, tais como arg, asp, his, lys e glu) e substituído por um aminoácido neutro ou negativamente carregado (mais preferencialmente alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com o antigénio. Essas localizações de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional às substituições são então refinadas mediante a introdução de mais ou de outras variantes nos locais de substituição, ou para os mesmos. Deste modo, enquanto o local para a introdução de uma variação da sequência de aminoácidos é predeterminado, a natureza da mutação em si mesma não necessita de ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação num determinado local, é realizada a mutagénese de varrimento por ala ou aleatória no codão-alvo ou na região, e as variantes de anticorpo expressadas são rastreadas relativamente à atividade desejada. A mutagénese de varrimento por bibliotecas, conforme aqui descrito, também pode ser utilizada para identificar localizações num anticorpo que sejam adequadas para a mutagénese ou modificação.

As inserções da sequência de aminoácidos incluem fusões de carboxi-terminal e/ou amino-terminal cujo comprimento varia entre um resíduo e polipéptidos com cem ou mais resíduos, bem como inserções intrassequência de um único ou múltiplos resíduos de aminoácidos. Os exemplos de inserções de terminal incluem um anticorpo com um resíduo de metionil N-terminal ou o anticorpo fundido com uma etiqueta de epítipo. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão no N-terminal ou C-terminal do anticorpo de uma enzima ou um polipéptido que aumenta a meia-vida do soro do anticorpo.

As variantes de substituição têm, pelo menos, um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo removida e um resíduo diferente inserido no respetivo lugar. Os locais

de maior interesse para mutagénese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas as alterações de FR também são contempladas. As substituições conservadoras são ilustradas na Tabela 1 por baixo do título “Substituições Conservadoras”. Se essas substituições resultarem numa alteração na atividade biológica, podem ser introduzidas mais alterações substanciais, denominadas “Substituições Exemplares” na Tabela 1, ou conforme ainda descrito abaixo relativamente às classes de aminoácido, e os produtos podem ser rastreados.

Tabela 1: Substituições de Aminoácidos

Resíduo Original	Substituições Conservadoras	Substituições Exemplares
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser

Resíduo Original	Substituições Conservadoras	Substituições Exemplares
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

As modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são realizadas mediante a seleção de substituições que sejam significativamente diferentes no respetivo efeito na manutenção (a) da estrutura da espinha dorsal do polipéptido na área da substituição, por exemplo, como uma conformação helicoidal ou em folhas, (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no local-alvo, ou (c) da capacidade da cadeia lateral. Os resíduos que ocorrem naturalmente são divididos em grupos com base nas propriedades de cadeia lateral comuns:

- (1) Hidrofóbico: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Hidrófilo neutro: Cys, Ser, Thr;
- (3) Ácido: Asp, Glu;
- (4) Básico: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) Resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro; e
- (6) Aromático: Trp, Tyr, Phe.

As substituições não conservadoras são criadas mediante a troca de um membro de uma destas classes por outra classe.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação apropriada do anticorpo também pode ser substituído, geralmente por serina, para melhorar a estabilidade oxidante da molécula e prevenir uma reticulação aberrante. Reciprocamente, as ligações de cisteína podem ser adicionadas ao anticorpo para melhorar a respetiva estabilidade, em particular quando o anticorpo é um fragmento de anticorpo, tal como um fragmento Fv.

As modificações de aminoácidos podem variar entre a alteração ou modificação de um ou mais aminoácidos e a reformulação completa do desenho de uma região, tal como a região variável. As alterações na região variável podem alterar a especificidade e/ou afinidade de ligação. Em algumas formas de realização, não são efetuadas mais de uma a cinco substituições de aminoácidos conservadoras num domínio CDR. Noutras formas de realização, não são efetuadas mais de uma a três substituições de aminoácidos conservadoras num domínio de CDR3. Noutras formas de realização ainda, o domínio CDR é CDRH3 e/ou CDR L3.

As modificações incluem igualmente polipéptidos glicosilados e não glicosilados, bem como polipéptidos com outras modificações pós-tradução, tais como, por exemplo, glicosilação com açúcares diferentes, acetilação e fosforilação. Os anticorpos são glicosilados em posições conservadas nas respetivas regiões constantes (Jefferis e Lund, 1997, *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright e Morrison, 1997, *TibTECH* 15:26-32). As cadeias laterais de oligossacáridos das imunoglobulinas afetam a função da proteína (Boyd et al., 1996, *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe e Howard, 1990, *Biochem.* 29:4175-4180) e a interação intramolecular entre porções da glicoproteína, o que pode afetar a conformação e a superfície tridimensional apresentada da glicoproteína (Hefferis e Lund, supra; Wyss e Wagner, 1996, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416). Os oligossacáridos também podem servir para direcionar uma determinada glicoproteína para determinadas moléculas baseadas em estruturas de reconhecimento específicas. A glicosilação de anticorpos foi igualmente declarada como tendo influência na citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Em particular, as células CHO com expressão regulada por tetraciclina de β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII), uma formação catalisadora de glicosiltransferase de GlcNAc de bisseção,

foram declaradas como tendo melhorado a atividade ADCC (Umana et al., 1999, *Mature Biotech.* 17:176-180).

Normalmente, a glicosilação de anticorpos é N-ligada ou O-ligada. N-ligada refere-se à ligação da parte de hidrato de carbono à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências de tripéptidos asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, em que X corresponde a qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para a ligação enzimática da parte de hidrato de carbono à cadeia lateral de asparagina. Deste modo, a presença de uma destas sequências de tripéptidos num polipéptido cria um possível local de glicosilação. A glicosilação O-ligada refere-se à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais habitualmente serina ou treonina, embora também possa ser utilizado 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina.

A adição de locais de glicosilação ao anticorpo é realizada convenientemente mediante a alteração da sequência de aminoácidos, de modo a conter uma ou mais das sequências de tripéptidos descritas acima (para locais de glicosilação N-ligada). A alteração também pode ser efetuada mediante a adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina na sequência do anticorpo original (para locais de glicosilação O-ligada).

O padrão de glicosilação de anticorpos pode ser igualmente alterado sem alterar a sequência de nucleótidos subjacente. A glicosilação depende grandemente da célula hospedeira utilizada para expressar o anticorpo. Uma vez que o tipo de célula utilizado para expressão de glicoproteínas recombinantes, por ex. anticorpos, como terapêutica possível é raramente a célula nativa, podem ser esperadas variações no padrão de glicosilação dos anticorpos (consulte, e.g. Hse et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070).

Além da escolha das células hospedeiras, os fatores que afetam a glicosilação durante a produção recombinante de anticorpos incluem o modo de crescimento, a formulação dos meios, a densidade da cultura, a oxigenação, o pH, os esquemas de purificação e afins. Foram propostos vários métodos para alterar o padrão de glicosilação alcançado num organismo hospedeiro específico, incluindo a introdução ou sobre-expressão de determinadas enzimas envolvidas na produção de oligossacáridos (Patentes U.S. 5.047.335; 5.510.261 e 5.278.299). A glicosilação, ou determinados tipos de glicosilação, pode ser removida enzimaticamente da glicoproteína, por exemplo utilizado endoglicosidase H (Endo H). Além disso, a célula hospedeira recombinante pode ser manipulada geneticamente para ser defeituosa no processamento de determinados tipos de polissacáridos. Estas técnicas e outras semelhantes são bem conhecidas na técnica.

Outros métodos de modificação incluem a utilização de técnicas de união conhecidas na técnica, incluindo, mas não se limitando a, meios enzimáticos, substituição oxidante e quebração. As modificações podem ser utilizadas, por exemplo, para ligação de rótulos para imunoensaio. Os polipéptidos E3 modificados são criados utilizando procedimentos estabelecidos na técnica e podem ser rastreados utilizando ensaios padrão conhecidos na técnica, e alguns dos quais são descritos abaixo nos Exemplos.

Outras modificações de anticorpo incluem anticorpos que foram modificados conforme descrito na Publicação PCT n.º WO 99/58572, publicada a 18 de novembro de 1999. Estes anticorpos compreendem, além de um domínio de ligação direcionado para a molécula-alvo, um domínio efetor que contém uma sequência de aminoácidos substancialmente homóloga a todo ou parte de um domínio constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina humana. Estes anticorpos são capazes de ligar a molécula-alvo sem acionar uma lise

dependente do complemento significativa, ou a destruição mediada por células do alvo. Em algumas formas de realização, o domínio efetor é capaz de ligar especificamente FcRn e/ou FcγRIIb. Normalmente, estes baseiam-se nos domínios quiméricos derivados de um ou mais domínios CH2 de cadeia pesada de imunoglobulina humana. Os anticorpos modificados deste modo são particularmente adequados para a utilização na terapia de anticorpo crónica, para evitar reações inflamatórias e outras reações adversas à terapia de anticorpo convencional.

A invenção abrange igualmente proteínas de fusão que compreendem um ou mais fragmentos ou regiões dos anticorpos (tal como E3) ou polipéptidos desta invenção. Numa forma de realização, é fornecido um polipéptido de fusão que compreende, pelo menos, 10 aminoácidos contíguos da região de cadeia leve variável ilustrada na Figura 1B e/ou, pelo menos, 10 aminoácidos da região de cadeia pesada variável ilustrada na Figura 1A. Noutra forma de realização, o polipéptido de fusão compreende uma região variável de cadeia leve e/ou uma região variável de cadeia pesada de E3, conforme ilustrado nas Figuras 1A e 1B. Noutra forma de realização, o polipéptido de fusão compreende uma ou mais CDRs de E3. Noutras formas de realização ainda, o polipéptido de fusão compreende CDR H3 e/ou CDR L3 de anticorpo E3. Noutra forma de realização, o polipéptido de fusão compreende qualquer um ou mais dos seguintes: resíduo de aminoácido L29 de CDRH1, I50 de CDRH2, W101 de CDRH3, e/ou A103 de CDRH3; e/ou resíduo de aminoácido S28 de CDRL1, N32 de CDRL1, T51 de CDRL2, 91E de CDRL3 e/ou H92 de CDRL3. Para efeitos desta invenção, uma proteína de fusão E3 contém um ou mais anticorpos E3 e outra sequência de aminoácidos à qual não é ligada na molécula nativa, por exemplo, uma sequência heteróloga ou uma sequência homóloga de outra região. As sequências heterólogas exemplares incluem, mas não se limitam a, uma "etiqueta", tal como uma

etiqueta FLAG ou uma etiqueta 6His. As etiquetas são bem conhecidas na técnica.

Um polipéptido de fusão E3 pode ser criado através de métodos conhecidos na técnica, por exemplo, de forma sintética ou recombinante. Normalmente, as proteínas de fusão E3 desta invenção são criadas mediante preparação e expressão de um polinucleótido que as codifica utilizando métodos recombinantes aqui descritos, embora também possam ser preparadas através de outros meios conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, síntese química.

Esta invenção fornece igualmente composições que compreendem polipéptidos ou anticorpos E3 conjugados (por exemplo, ligados) com um agente que facilita a união a um suporte sólido (tal como biotina ou avidina). Para facilitar, será feita geralmente referência a E3 ou anticorpos com o conhecimento de que estes métodos se aplicam a qualquer uma das formas da realização de ligação de NGF aqui descritas. Em geral, a conjugação refere-se à ligação destes componentes, conforme aqui descrito. A ligação (que, de um modo geral, corresponde à fixação destes componentes numa associação próxima, pelo menos, para a administração) pode ser alcançada de diversas formas. Por exemplo, é possível uma reação direta entre um agente e um anticorpo quando cada um tiver um substituinte capaz de reagir com o outro. Por exemplo, um grupo nucleofílico, tal como um grupo amino ou sulfidrílo, num deles pode ser capaz de reagir com um grupo que contém carbonilo, tal como um anidrido ou um halogeneto ácido, ou com um grupo alquilo que contém um bom grupo de saída (por ex., a halogeneto) no outro.

Um anticorpo ou polipéptido desta invenção pode ser ligado a um agente de rotulação (em alternativa denominado "rótulo"), tal como uma molécula fluorescente, uma molécula radioativa ou quaisquer outros rótulos conhecidos na técnica. Os rótulos conhecidos na técnica fornecem

geralmente (direta ou indiretamente) um sinal. Por conseguinte, a invenção inclui anticorpos e polipéptidos rotulados.

A capacidade dos anticorpos e polipéptidos desta invenção, tal como ligação de NGF; redução ou inibição de uma atividade biológica de NGF; redução e/ou bloqueio da sobrevivência induzida por NGF de neurónios trigeminais de ratinho E13.5, pode ser testada utilizando métodos conhecidos na técnica, e alguns dos quais são descritos nos Exemplos.

A invenção fornece igualmente composições (incluindo composições farmacêuticas) e kits que compreendem o anticorpo E3 e, como é claro nesta divulgação, qualquer um ou todos os anticorpos e/ou polipéptidos aqui descritos.

Polinucleótidos, vetores e células hospedeiras

A invenção fornece igualmente polinucleótidos isolados que codificam os anticorpos e polipéptidos da invenção (incluindo um anticorpo que compreende as sequências de polipéptidos das regiões variáveis de cadeia leve e cadeia pesada ilustradas nas Figuras 1A e 1B) e vetores e células hospedeiras que compreendem o polinucleótido.

Por conseguinte, a invenção fornece polinucleótidos (ou composições, incluindo composições farmacêuticas), que compreendem polinucleótidos que codificam qualquer um dos seguintes: (a) anticorpo E3; (b) um fragmento ou uma região do anticorpo E3; (c) uma cadeia leve do anticorpo E3 conforme ilustrado na Figura 1B; (d) uma cadeia pesada do anticorpo E3 conforme ilustrado na Figura 1A; (e) uma ou mais regiões variáveis de uma cadeia leve e/ou de uma cadeia pesada do anticorpo E3; (f) uma ou mais CDRs (uma, duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs) do anticorpo E3 ilustradas nas Figuras 1A e 1B; (g) CDR H3 da cadeia pesada do anticorpo E3 ilustrada na Figure 1A; (h) CDR L3 da cadeia leve do anticorpo E3 ilustrada na Figura 1B; (i) três CDRs da cadeia leve do anticorpo E3 ilustradas na

Figura 1B; (j) três CDRs da cadeia pesada do anticorpo E3 ilustradas na Figura 1A; (k) três CDRs da cadeia leve e três CDRs da cadeia pesada do anticorpo E3 ilustradas nas Figuras 1A e 1B; ou (l) um anticorpo que compreende qualquer um de (b) a (k). Em algumas formas de realização, o polinucleótido compreende um ou ambos os polinucleótidos ilustrados nas Figuras 2 e 3.

Noutro aspeto, a invenção corresponde a um polinucleótido isolado que codifica uma cadeia leve E3 com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4893 ou ATCC N.º PTA-4894. Noutro aspeto, a invenção corresponde a um polinucleótido isolado que codifica uma cadeia pesada E3 com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895. Ainda noutro aspeto, a invenção corresponde a um polinucleótido isolado que compreende (a) uma região variável codificada no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4894 e (b) uma região variável codificada no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895. Noutro aspeto, a invenção corresponde a um polinucleótido isolado que compreende (a) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4894; e/ou (b) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N.º PTA-4895.

Noutro aspeto, a invenção fornece polinucleótidos que codificam qualquer um dos anticorpos (incluindo fragmentos de anticorpo) e polipéptidos aqui descritos. Os polinucleótidos podem ser criados através de procedimentos conhecidos na técnica.

Noutro aspeto, a invenção fornece composições (tais como composições farmacêuticas) que compreendem qualquer um dos polinucleótidos da invenção. Em algumas formas de realização, a composição compreende um vetor de expressão que compreende um polinucleótido que codifica o anticorpo E3 conforme aqui descrito. Noutra forma de realização, a

composição compreende um vetor de expressão que compreende um polinucleótido que codifica qualquer dos anticorpos ou polipéptidos aqui descritos. Noutras formas de realização ainda, a composição compreende um ou ambos os polinucleótidos ilustrados nas Figuras 2 e 3. Os vetores de expressão e a administração de composições de polinucleótidos são aqui descritos mais adiante.

Noutro aspeto, a invenção fornece um método de criação de qualquer um dos polinucleótidos aqui descritos.

Os polinucleótidos complementares a qualquer uma das sequências também são abrangidos pela presente invenção. Os polinucleótidos podem ser de cadeia única (codificação ou antissentido) ou de cadeia dupla, e podem ser moléculas de ADN (genómico, ADNc ou sintético) ou de ARN. As moléculas de ARN incluem moléculas ARN_{hn}, que contêm intrões e correspondem a uma molécula de ADN num modo um-para-um, e moléculas ARN_m, que não contêm intrões. As sequências de codificação ou não codificação adicionais podem, mas não necessitam, estar presentes num polinucleótido da presente invenção, e um polinucleótido pode, mas não necessita, ser ligado a outras moléculas e/ou materiais de suporte.

Os polinucleótidos podem compreender uma sequência nativa (ou seja, uma sequência endógena que codifica um anticorpo ou uma porção do mesmo) ou podem compreender uma variante dessa sequência. As variantes de polinucleótido contêm uma ou mais substituições, adições, deleções e/ou inserções, de modo a que a imunorreatividade do polipéptido codificado não seja diminuída, em relação a uma molécula imunorreativa nativa. Geralmente, o efeito na imunorreatividade do polipéptido codificado pode ser estimado conforme aqui descrito. Preferencialmente, as variantes mostram, pelo menos, cerca de 70% de identidade, mais preferencialmente, pelo menos, cerca de 80% de identidade e mais preferencialmente, pelo menos, cerca de 90% de identidade para uma sequência de polinucleótidos que

codifica um anticorpo nativo ou uma porção do mesmo.

É suposto duas sequências de polinucleótidos ou polipéptidos serem "idênticas" se a sequência de nucleótidos ou de aminoácidos nas duas sequências for a mesma quando alinhada para uma correspondência máxima conforme descrito abaixo. As comparações entre duas sequências são efetuadas normalmente comparando as sequências sobre uma janela de comparação para identificar e comparar regiões locais de similaridade de sequência. Uma "janela de comparação", conforme aqui utilizado, refere-se a um segmento de, pelo menos, cerca de 20 posições contíguas, habitualmente 30 a cerca de 75, 40 a cerca de 50, na qual uma sequência pode ser comparada com uma sequência de referência do mesmo número de posições contíguas depois de as duas sequências serem otimamente alinhadas.

O alinhamento ótimo das sequências para comparação pode ser realizado utilizando o programa Megalign do conjunto Lasergene de software de bioinformática (DNASTAR, Inc., Madison, WI), utilizando parâmetros predefinidos. Este programa inclui diversos esquemas de alinhamento descritos nas seguintes referências: Dayhoff, M.O. (1978) *A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships*. Em Dayhoff, M.O. (ed.) *Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3*, págs. 345 a 358; Hein J., 1990, *Unified Approach to Alignment and Phylogenesis*, págs. 626 a 645 *Methods in Enzymology* vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. e Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. e Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, *Comb. Theor.* 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425; Sneath, P.H.A. e Sokal, R.R., 1973, *Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. e

Lipman, D.J., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 80:726-730.

Preferencialmente, a "percentagem de identidade de sequência" é determinada comparando duas sequências otimamente alinhadas sobre uma janela de comparação de, pelo menos, 20 posições, em que a porção da sequência de polinucleótidos ou polipéptidos na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (ou seja, lacunas) ou 20 por cento ou menos, habitualmente 5 a 15 por cento, ou 10 a 12 por cento, em comparação com as sequências de referência (que não compreendem adições nem deleções) para o alinhamento ótimo das duas sequências. A percentagem é calculada mediante a determinação do número de posições nas quais as bases idênticas de ácido nucleico ou o resíduo de aminoácidos ocorrem em ambas as sequências para produzir o número de posições correspondentes, dividindo o número de posições correspondentes pelo número total de posições na sequência de referência (ou seja, o tamanho da janela) e multiplicando os resultados por 100 para produzir a percentagem de identidade de sequência.

As variantes podem igualmente, ou em alternativa, ser substancialmente homólogas a um gene nativo; ou uma porção ou complemento do mesmo. Essas variantes de polinucleótido podem ser hibridizadas em condições moderadamente rigorosas numa sequência de ADN que ocorre naturalmente e que codifica um anticorpo nativo (ou uma sequência complementar).

As "condições moderadamente rigorosas" adequadas incluem a pré-lavagem numa solução de 5 X SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0); hibridização entre 50 °C e 65 °C, 5 X SSC, durante a noite; seguida da lavagem, por duas vezes, a 65 °C durante 20 minutos com cada um de 2X, 0,5X e 0,2X SSC contendo 0,1% SDS.

Conforme aqui utilizado, as "condições altamente rigorosas" ou as "condições de alto rigor" são as que: (1) utilizam uma força iónica baixa e uma temperatura alta para

a lavagem, por exemplo 0,015 M de cloreto de sódio/0,0015 M de citrato de sódio/0,1% de dodecilsulfato de sódio a 50 °C; (2) utilizam, durante a hibridização, um agente de desnaturação, tal como formamida, por exemplo, 50% (v/v) de formamida com 0,1% de soroalbumina bovina/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/50mM de tampão de fosfato de sódio com pH 6,5 com 750 mM de cloreto de sódio, 75 mM de citrato de sódio a 42 °C; ou (3) utilizam 50% de formamida, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sódio, 5 x solução de Denhardt, ADN de sêmen de salmão sonificado (50 µg/ml), 0,1% SDS, e 10% de sulfato de dextrano a 42 °C, com lavagens a 42 °C em 0,2 x SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio) e 50% de formamida a 55 °C, seguidas de uma lavagem de alto rigor que consiste em 0,1 x SSC que contém EDTA a 55 °C. O perito na técnica irá reconhecer a forma como ajustar a temperatura, a força iônica, etc. conforme necessário para adaptar os fatores, tais como o comprimento da sonda e afins.

Será óbvio para os peritos na técnica que, como resultado da degeneração do código genético, existem muitas sequências de nucleótidos que codificam um polipéptido conforme aqui descrito. Alguns destes polinucleótidos transportam uma homologia mínima para a sequência de nucleótidos de qualquer gene nativo. Contudo, os polinucleótidos que variam devido a diferenças na utilização do codão são especificamente contemplados pela presente invenção. Além disso, os alelos dos genes que compreendem as sequências de polinucleótidos aqui fornecidas estão inseridos no âmbito da presente invenção. Os alelos são genes endógenos que são alterados como resultado de uma ou mais mutações, tais como deleções, adições e/ou substituições de nucleótidos. A proteína e ARNm resultantes podem, mas não necessitam, ter uma estrutura ou função alterada. Os alelos podem ser

identificados utilizando técnicas padrão (tais como hibridização, amplificação e/ou comparação de sequências da base de dados).

Os polinucleótidos desta invenção podem ser obtidos utilizando síntese química, métodos recombinantes ou PCR. Os métodos de síntese química de polinucleótidos são bem conhecidos na técnica e não necessitam de ser aqui descritos em detalhe. Um perito na técnica pode utilizar as sequências aqui fornecidas e um sintetizador de ADN comercial para produzir uma sequência de ADN desejada.

Para preparar polinucleótidos utilizando métodos recombinantes, um polinucleótido que compreende uma sequência desejada pode ser inserido num vetor adequado e, como consequência, o vetor pode ser introduzido numa célula hospedeira adequada para replicação e amplificação, conforme aqui apresentado mais adiante. Os polinucleótidos podem ser inseridos em células hospedeiras através de qualquer meio conhecido na técnica. As células são transformadas introduzindo um polinucleótido exógeno mediante absorção direta, endocitose, transfeção, conjugação F ou eletroporação. Depois de introduzido, o polinucleótido exógeno pode ser mantido na célula como um vetor não integrado (tal como um plasmídeo) ou integrado no genoma da célula hospedeira. O polinucleótido assim amplificado pode ser isolado da célula hospedeira através de métodos bem conhecidos na técnica. Consulte, por ex., Sambrook et al. (1989).

Em alternativa, PCR permite a reprodução de sequências de ADN. A tecnologia PCR é bem conhecida na técnica e é descrita nas Patentes U.S. 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 e 4.683.202, bem como *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, Mullis et al. eds., Birkauser Press, Boston (1994).

O ARN pode ser obtido mediante a utilização do ADN isolado num vetor apropriado e respetiva inserção numa célula hospedeira adequada. Quando a célula é replicada e o

ADN é transcrito no ARN, o ARN pode então ser isolado utilizando métodos bem conhecidos dos peritos na técnica, conforme apresentado em Sambrook et al., (1989), por exemplo.

Os vetores de clonagem adequados podem ser construídos de acordo com técnicas padrão, ou podem ser selecionados a partir de um grande número de vetores de clonagem disponíveis na técnica. Enquanto o vetor de clonagem selecionado pode variar de acordo com a célula hospedeira destinada a ser utilizada, os vetores de clonagem úteis terão geralmente a capacidade de se autorreplicarem, podem ter um único alvo para uma endonuclease de restrição específica, e/ou podem transportar genes para um marcador que pode ser utilizado na seleção de clones que contêm o vetor. Os exemplos adequados incluem plasmídeos e vírus bacterianos, por ex., pUC18, pUC19, Bluescript (por ex., pBS SK+) e respectivos derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, Cole1, pCR1, RP4, ADNs de bacteriófagos, e vetores de transporte, tais como pSA3 e pAT28. Estes e muitos outros vetores de clonagem estão disponíveis em fornecedores, tais como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Geralmente, os vetores de expressão são construções de polinucleótidos replicáveis que contêm um polinucleótido de acordo com a invenção. Está implícito que um vetor de expressão tem de ser replicável nas células hospedeiras, quer como epissomas quer como uma parte integrante do ADN cromossómico. Os vetores de expressão adequados incluem, mas não se limitam a, plasmídeos, vetores virais, incluindo adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus, cosmídeos, e vetores de expressão divulgados na Publicação PCT n.º WO 87/04462. Em geral, os componentes de vetor podem incluir, mas não se limitam a, um ou mais dos seguintes: uma sequência de sinais; uma origem de replicação; um ou mais genes marcadores; elementos de controlo de transcrição adequados (tais como promotores, intensificadores e

terminador). Para a expressão (ou seja, tradução), são também habitualmente requeridos um ou mais elementos de controlo de tradução, tais como locais de ligação do ribossoma, locais de iniciação de tradução e codões de terminação.

Os vetores que contêm os polinucleótidos de interesse podem ser introduzidos na célula hospedeira através de qualquer um dos diversos meios apropriados, incluindo eletroporação, transfeção utilizando cloreto de cálcio, cloreto de rubídio, fosfato de cálcio, DEAE-dextrano, ou outras substâncias; bombardeamento de microprojéteis; lipofecção; e infeção (por ex., quando o vetor é um agente infeccioso, tal como um vírus vaccinia). A escolha de introduzir vetores ou polinucleótidos dependerá frequentemente das características da célula hospedeira.

A invenção fornece igualmente células hospedeiras que compreendem qualquer um dos polinucleótidos aqui descritos. Todas as células hospedeiras capazes de sobre-expressar ADNs heterólogos podem ser utilizadas para fins de isolamento dos genes que codificam o anticorpo, o polipéptido ou a proteína de interesse. Os exemplos não limitativos de células hospedeiras de mamífero incluem, mas não se limitam a, células COS, HeLa e CHO. Consulte igualmente a Publicação PCT n.º WO 87/04462. As células hospedeiras adequadas sem ser de mamífero incluem procariontes (tais como, *E. coli* ou *B. subtilis*) e de levedura (tais como, *S. cerevisiae*, *S. pombe*; ou *K. lactis*). Preferencialmente, as células hospedeiras expressam os ADNs num nível de cerca de 5 vezes a mais, mais preferencialmente 10 vezes a mais, ainda mais preferencialmente 20 vezes a mais em relação ao do anticorpo endógeno correspondente ou proteína de interesse, se presente, nas células hospedeiras. O rastreio das células hospedeiras relativamente a uma ligação específica ao NGF é efetuado por um imunoensaio ou FACS. É possível

identificar uma célula que sobre-expressa o anticorpo ou proteína de interesse.

Métodos utilizando E3 e anticorpos derivados E3

O anticorpo E3 que liga o NGF pode ser utilizado para identificar ou detetar a presença ou ausência do NGF. Para facilitar, será feita geralmente referência a E3 ou anticorpos com o conhecimento de que estes métodos se aplicam a qualquer uma das formas da realização de ligação de NGF (tais como polipéptidos) aqui descritas. Em geral, a deteção implica a colocação de uma amostra biológica em contacto com um anticorpo aqui descrito que liga ao NGF e a formação de um complexo entre o NGF e um anticorpo (por ex., E3) que liga especificamente ao NGF. A formação desse complexo pode ser *in vitro* ou *in vivo*. O termo "deteção", conforme aqui utilizado, inclui a deteção qualitativa e/ou quantitativa (níveis de medição) com ou sem referência a um controlo.

É possível utilizar qualquer um de vários métodos conhecidos para a deteção, incluindo, mas não se limitando a, imunoensaio, utilizando um anticorpo que liga o polipéptido, por ex. através de um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e afins; e ensaio funcional para o polipéptido codificado, por ex., atividade de ligação ou ensaio enzimático. Em algumas formas de realização, o anticorpo é rotulado de forma detetável.

Utilizações de Diagnóstico do E3 e Derivados

Os anticorpos e polipéptidos da invenção podem ser utilizados na deteção, no diagnóstico e na monitorização de uma doença, condição ou distúrbio associados a uma expressão de NGF alterada ou aberrante (em algumas formas de realização, maior ou menos expressão de NGF (em relação a uma amostra normal), e/ou expressão inapropriada, tal como presença de expressão nos tecidos e/ou células que normalmente não têm expressão de NGF, ou ausência de

expressão de NGF nos tecidos ou células que normalmente têm expressão de NGF). Os anticorpos e polipéptidos da invenção são ainda úteis para a deteção da expressão de NGF, por exemplo, numa doença associada a sensibilidade ou recetividade alterada ou aberrante ao NGF. Em algumas formas de realização, a expressão de NGF é detetada numa amostra de um indivíduo suspeito de ter uma doença, um distúrbio com, ou associado a, uma sensibilidade ou recetividade alterada ou aberrante à expressão de NGF (por ex., um cancro no qual o NGF provoca crescimento e/ou metástase).

Deste modo, são descritos métodos que compreendem a colocação de um espécime (amostra) de um indivíduo suspeito de ter uma expressão de NGF alterada ou aberrante em contacto com um anticorpo ou polipéptido da invenção e a determinação sobre se o nível de NGF difere do existente num espécime de comparação ou controlo. Em algumas formas de realização, o indivíduo tem uma arritmia cardíaca, doença de Alzheimer e/ou disfunção autónoma.

São descritos igualmente métodos que compreendem a colocação de um espécime (amostra) de um indivíduo em contacto e a determinação do nível de expressão de NGF. Em algumas formas de realização, o indivíduo é suspeito de ter uma doença, um distúrbio com, ou associado a, sensibilidade ou recetividade alterada ou aberrante à expressão de NGF. Em algumas formas de realização, o indivíduo tem cancro do pulmão de pequenas células, cancro da mama, cancro pancreático, cancro da próstata, carcinoma do ovário, carcinoma hepatocelular ou melanoma.

Para aplicações de diagnóstico, normalmente o anticorpo será rotulado com uma parte detetável incluindo, mas não se limitando a, radioisótopos, rótulos fluorescentes e vários rótulos de enzima-substrato. Os métodos de conjugação de rótulos para um anticorpo são conhecidos na técnica. Noutra forma de realização da

invenção, os anticorpos da invenção não necessitam de ser rotulados, e a presença dos mesmos pode ser detetada utilizando um anticorpo rotulado que liga aos anticorpos da invenção.

Os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados em qualquer método de ensaio conhecido, tais como ensaios de ligação competitiva, ensaios em sanduíche direta e indireta e ensaios de imunoprecipitação. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs. 147 a 158 (CRC Press, Inc. 1987).

Os anticorpos também podem ser utilizados para ensaios de diagnóstico *in vivo*, tal como imagiologia *in vivo*. Geralmente, o anticorpo é rotulado com um radionuclídeo (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I ou ^3H), de modo a que as células ou o tecido de interesse possam ser localizados utilizando imunocintigrafia.

O anticorpo também pode ser utilizado como reagente de coloração na patologia, seguindo técnicas bem conhecidas na técnica.

Métodos de utilização de E3 e derivados para fins terapêuticos

O anticorpo E3 é útil para reduzir e/ou bloquear a atividade biológica de NGF. Crê-se que esta atividade antagónica é útil no tratamento de condições patológicas associadas à produção de NGF endógeno, tal como dor. Em geral, nestas formas de realização, é administrada uma quantidade eficaz a um indivíduo. Por conseguinte, num aspeto, a invenção fornece um método de antagonismo da atividade biológica de NGF humano utilizando qualquer um dos polipéptidos (incluindo anticorpos, tal como o anticorpo E3) aqui divulgados. Numa forma de realização, o método compreende o a colocação do fator de crescimento do nervo humano em contacto com qualquer um dos polipéptidos (incluindo o anticorpo E3) aqui descritos, em que a atividade do fator de crescimento do nervo humano é

antagonizada, reduzida, bloqueada ou suprimida. Ainda noutra forma de realização, é fornecido tratamento com E3 a um indivíduo com dor (tal como dor pós-cirúrgica ou dor de artrite reumatoide).

Para facilitar, será feita geralmente referência a E3 ou anticorpo com o conhecimento de que estes métodos se aplicam a qualquer uma dos polipéptidos e anticorpos de variante E3 aqui descritos.

Várias formulações de E3 ou fragmentos de E3 (por ex., Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), tais como cadeia única (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão que compreendem uma porção de anticorpo, e qualquer outra configuração modificada de E3 que compreenda um local de reconhecimento do antigénio NGF da especificidade requerida podem ser utilizadas para a administração. Em algumas formas de realização, os anticorpos E3 ou várias formulações de E3 dos mesmos podem ser administrados puros. Noutras formas de realização, E3 ou várias formulações de E3 (incluindo qualquer forma de realização da composição aqui descrita) e um excipiente farmacologicamente aceitável são administrados, e pode ser em várias formulações. Os excipientes farmacologicamente aceitáveis são conhecidos na técnica, e são substâncias relativamente inertes que facilitam a administração de uma substância farmacologicamente eficaz. Por exemplo, um excipiente pode fornecer forma ou consistência, ou funcionar como um diluente. Os excipientes adequados incluem, mas não se limitam a, agentes de estabilização, agentes de humedecimento e emulsão, sais para osmolaridade variável, agentes de encapsulamento, tampões e intensificadores de penetração na pele. Os excipientes, bem como as formulações para administração parentérica e não parentérica de fármaco, são apresentados em Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20^a Ed. Mack Publishing (2000).

Em algumas formas de realização, estes agentes são

formulados para administração por injeção (por ex., via intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intramuscular, etc.), embora também possam ser utilizadas outras formas de administração (por ex., oral, via mucosa, via inalação, sublingual, etc.). Por conseguinte, o anticorpo E3 e equivalentes do mesmo são combinados preferencialmente com veículos farmacologicamente aceitáveis, tais como salina, solução de Ringer, solução de dextrose e afins. O regime de dosagem específico, ou seja, dose, regulação do tempo e repetição, dependerá de cada indivíduo e do respetivo historial médico. Geralmente, pode ser utilizada qualquer uma das seguintes doses: uma dose de, pelo menos, cerca de 50 mg/kg de peso corporal; pelo menos, cerca de 10 mg/kg de peso corporal; pelo menos, cerca de 3 mg/kg de peso corporal; pelo menos, cerca de 1 mg/kg de peso corporal; pelo menos, cerca de 750 µg/kg de peso corporal; pelo menos, cerca de 500 µg/kg de peso corporal; pelo menos, cerca de 250 µg/kg de peso corporal; pelo menos, cerca de 100 µg/kg de peso corporal; pelo menos, cerca de 50 µg/kg de peso corporal; pelo menos, cerca de 10 µg/kg de peso corporal; pelo menos, cerca de 1 µg/kg de peso corporal, ou menos. Para administrações repetidas durante diversos dias ou mais longas, dependendo da condição, o tratamento é prolongado até ocorrer uma supressão desejada dos sintomas da doença. Um regime de dosagem exemplar compreende a administração de uma dose inicial de cerca de 2 mg/kg, seguida de uma dose de manutenção semanal de cerca de 1 mg/kg do anticorpo anti-NGF, ou seguida de uma dose de manutenção de cerca de 1 mg/kg semana sim, semana não. Contudo, outros regimes de dosagem podem ser úteis, dependendo do padrão de declínio farmacocinético que o médico deseja alcançar. As considerações empíricas, tal como a meia vida, irão contribuir em geral para a determinação da dosagem. O progresso desta terapia é facilmente monitorizado por ensaios e técnicas

convencionais.

Em alguns indivíduos, pode ser requerida mais de uma dose. A frequência de administração pode ser determinada e ajustada durante a terapia. Por exemplo, a frequência de administração pode ser determinada ou ajustada com base no tipo e gravidade da dor a ser tratada, se o agente é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, na terapia anterior, no historial clínico e resposta do paciente ao agente, e no discernimento do médico assistente. Normalmente, o clínico irá administrar um anticorpo antagonista anti-NGF (tal como E3) até ser atingida uma dosagem que alcance o resultado desejado. Em alguns casos, as formulações de libertação contínua prolongada de anticorpos E3 podem ser apropriadas. São conhecidas na técnica várias formulações e dispositivos para alcançar a libertação prolongada.

Numa forma de realização, as dosagens para anticorpos E3 (ou polipéptidos) podem ser determinadas empiricamente nos indivíduos que tenham recebido uma ou mais administrações. Os indivíduos recebem dosagens incrementais de E3. Para estimar a eficácia de E3 ou outro anticorpo equivalente, os marcadores dos sintomas da doença (tal como dor) podem ser monitorizados.

A administração de um anticorpo (tal como E3) ou polipéptido de acordo com as utilizações médicas na presente invenção pode ser contínua ou não contínua, dependendo, por exemplo, da condição fisiológica do recipiente, independentemente de a finalidade da administração ser terapêutica ou profilática, e de outros fatores conhecidos dos médicos. A administração de um anticorpo pode ser essencialmente contínua durante um período de tempo pré-selecionado ou pode ser numa série de doses espaçadas, por ex., antes, durante ou após o desenvolvimento da dor, antes, durante, antes e após, durante e após, ou antes, durante e após o desenvolvimento

da dor. A administração pode ser antes, durante e/ou após a ferida, a incisão, o traumatismo, a cirurgia e qualquer outro evento capaz de provocar dor pós-cirúrgica.

Outras formulações incluem formas de ministração adequadas conhecidas na técnica incluindo, mas não se limitando a, portadores, tais como lipossomas. Consulte, por exemplo, Mahato et al. (1997) *Pharm. Res.* 14:853-859. As preparação de lipossomas incluem, mas não se limitam a, citofetinas, vesículas multilamelares e vesículas unilamelares.

Em algumas formas de realização, pode estar presente mais de um anticorpo ou polipéptido. Os anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais. Essas composições podem conter pelo menos um, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco anticorpos diferentes. Uma mistura de anticorpos, tal como é referido frequentemente na técnica, pode ser particularmente útil no tratamento de um intervalo mais amplo de população de indivíduos.

Um polinucleótido que codifica qualquer um dos anticorpos ou polipéptidos da invenção (tal como o anticorpo E3) também pode ser utilizado para ministração e expressão de qualquer um dos anticorpos ou polipéptidos da invenção (tal como o anticorpo E3) numa célula desejada. É evidente que um vetor de expressão pode ser utilizado para direcionar a expressão de um polipéptido ou anticorpo E3. O vetor de expressão pode ser administrado através de qualquer meio conhecido na técnica, tal como via intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal, intraventricular, oral, entérica, parentérica, intranasal, dermal, sublingual, ou por inalação. Por exemplo, a administração de vetores de expressão inclui administração local ou sistêmica, incluindo injeção, administração oral, administração por cateter ou bombardeamento de partículas e administração tópica. Um

perito na técnica está familiarizado com a administração de vetores de expressão para obter a expressão de uma proteína exógena *in vivo*. Consulte, por ex., as Patentes U.S. 6.436.908; 6.413.942; e 6.376.471.

A ministração orientada de composições terapêuticas que compreendem um polinucleótido que codifica qualquer um dos anticorpos ou polipéptidos da invenção (tal como o anticorpo E3) também pode ser utilizada. As técnicas de ministração de ADN mediada pelo recetor são descritas em, por exemplo, Findeis et al., *Trends Biotechnol.* (1993) 11:202; Chiou et al., *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer* (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1988) 263:621; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1994) 269:542; Zenke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA)* (1990) 87:3655; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1991) 266:338. As composições terapêuticas que contêm um polinucleótido são administradas num intervalo de cerca de 100 ng a cerca de 200 mg de ADN para ministração local num protocolo de terapia de genes. Os intervalos de concentração de cerca de 500 ng a cerca de 50 mg, cerca de 1 µg a cerca de 2 mg, cerca de 5 µg a cerca de 500 µg, e cerca de 20 µg a cerca de 100 µg de ADN também podem ser utilizados durante um protocolo de terapia de genes. Os polipéptidos e polinucleótidos terapêuticos da presente invenção podem ser ministrados utilizando veículos de ministração de genes. O veículo de ministração de genes pode ser de origem viral ou não viral (consulte em geral, Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1994) 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy* (1994) 5:845; Connelly, *Human Gene Therapy* (1995) 1:185; e Kaplitt, *Nature Genetics* (1994) 6:148). A expressão dessas sequências de codificação pode ser induzida utilizando promotores heterólogos ou mamíferos endógenos. A expressão da sequência de codificação pode ser constitutiva ou regulada.

Os vetores virais para ministração de um

polinucleótido desejado e de uma expressão numa célula desejada são bem conhecidos na técnica. Os veículos virais exemplares incluem, mas não se limitam a, retrovírus recombinantes (consulte, por ex., as Publicações PCT n.ºs WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; as Patentes U.S. 5.219.740; 4.777.127; Patente GB 2.200.651; e Patente EP 0 345 242), vetores baseados em alfavírus (por ex., vetores de vírus Sindbis, vírus da floresta de Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), vírus Ross River (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) e vírus da encefalite equina venezuelana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), e vetores de vírus adeno-associados (AAV) (consulte, por ex., as Publicações PCT n.ºs WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 e WO 95/00655). A administração de ADN ligado a adenovírus inativado, conforme descrito em Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3:147, também pode ser utilizada.

Os métodos e veículos de ministração não virais também podem ser utilizados, incluindo, mas não se limitando a, ADN condensado polycatiónico ligado ou não ligado ao adenovírus inativado sozinho (consulte, por ex., Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3:147); ADN ligado ao ligando (consulte, por ex., Wu, *J. Biol. Chem.* (1989) 264:16985); células de veículos de ministração de células eucarióticas (consulte, por ex., Patente U.S. 5.814.482; Publicações PCT n.ºs WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; e WO 97/42338) e fusão ou neutralização de carga nucleica com membranas de células. O ADN nu também pode ser utilizado. Os métodos de introdução de ADN nu exemplares são descritos na Publicação PCT n.º WO 90/11092 e Patente U.S. 5.580.859. Os lipossomas que podem funcionar como veículos de ministração de genes são descritos na Patente U.S. 5.422.120; Publicações PCT n.ºs WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; e Patente EP 0 524 968. As abordagens adicionais são descritas em Philip,

Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411 e em Woffendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91:1581.

Relativamente a todos os métodos aqui descritos, a referência aos anticorpos antagonistas anti-NGF incluem igualmente as composições que compreendem um ou mais destes agentes. Estas composições podem ainda compreender excipientes adequados, tais como excipientes farmacologicamente aceitáveis, incluindo tampões, que são bem conhecidos na técnica. A presente invenção pode ser utilizada sozinha ou em conjunto com outros métodos de tratamento convencionais.

UTILIZAÇÃO DE ANTICORPO ANTAGONISTA ANTI-NGF PARA TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DA DOR DE ARTRITE REUMATOIDE

Em alguns aspetos, a invenção fornece utilizações médicas para o tratamento e/ou a prevenção da dor de artrite reumatoide em indivíduos, incluindo mamíferos, tanto humanos como não humanos. Por conseguinte, num aspeto, a invenção fornece utilizações médicas para o tratamento da dor de artrite reumatoide num indivíduo, que compreendem a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF. Os anticorpos antagonistas anti-NGF são conhecidos na técnica e descritos aqui.

Noutro aspeto, a invenção fornece utilizações médicas para a redução da incidência, o melhoramento, a supressão, a atenuação, e/ou o adiamento do começo, do desenvolvimento ou da progressão da dor de artrite reumatoide num indivíduo. Deste modo, em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado antes do desenvolvimento da dor ou de um episódio de dor num indivíduo com artrite reumatoide.

Noutro aspeto, a invenção fornece utilizações médicas para o tratamento de caquexia inflamatória (perda de peso) associada a artrite reumatoide num indivíduo, que compreendem a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF (Roubenoff et al., *Arthritis*

Rheum. 40(3): 534-9 (1997); Roubenoff et al., *J. Clin. Invest.* 93(6):2379-86 (1994)).

O diagnóstico ou estimativa da dor de artrite reumatoide está bem estabelecido na técnica. A estimativa pode ser efetuada com base em medidas conhecidas na técnica, tal como caracterização da dor do paciente utilizando várias escalas de dor. Consulte, por ex., Katz et al, *Surg Clin North Am.* (1999) 79 (2):231-52; Caraceni et al. *J Pain Symptom Manage* (2002) 23(3):239-55. Existem também escalas habitualmente utilizadas para medir o estado da doença, tais como o American College of Rheumatology (ACR) (Felson, et al., *Arthritis and Rheumatism* (1993) 36(6):729-740), o questionário HAQ (Health Assessment Questionnaire) (Fries, et al., (1982) *J. Rheumatol.* 9: 789-793), a Escala de Paulus (Paulus, et al., *Arthritis and Rheumatism* (1990) 33: 477-484), e a escala AIMS (Arthritis Impact Measure Scale) (Meenam, et al., *Arthritis and Rheumatology* (1982) 25: 1048-1053). O anticorpo antagonista anti-NGF pode ser administrado a um indivíduo através de qualquer via adequada. Os exemplos de vias de administração diferentes são aqui descritos.

O alívio da dor pode caracterizar-se pelo tempo de alívio. Por conseguinte, em algumas formas de realização, o alívio da dor é observado num prazo de cerca de 24 horas após a administração do anticorpo antagonista anti-NGF. Noutras formas de realização, o alívio da dor é observado num prazo de cerca de 36, 48, 60, 72 horas ou 4 dias após a administração do anticorpo antagonista anti-NGF. Noutras formas de realização ainda, o alívio da dor é observado antes de observar uma indicação de melhora da condição inflamatória associada à artrite reumatoide. Em algumas formas de realização, a frequência e/ou intensidade da dor diminui, e/ou a qualidade de vida das pessoas que sofrem da doença aumenta.

A criação e utilização de anticorpos antagonistas

anti-NGF para estes métodos são descritas nas secções abaixo (“Anticorpo antagonista anti-NGF”; “Identificação de anticorpos antagonistas anti-NGF”; “Administração de um anticorpo antagonista anti-NGF”).

UTILIZAÇÃO DE ANTICORPO ANTAGONISTA ANTI-NGF PARA TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DA DOR DE OSTEOARTRITE

Em alguns aspetos, a invenção fornece utilizações médicas para o tratamento e/ou a prevenção da dor de osteoartrite em indivíduos, incluindo mamíferos, tanto humanos como não humanos. Por conseguinte, num aspeto, a invenção fornece utilizações médicas para o tratamento da dor de osteoartrite num indivíduo, que compreendem a administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF. Os anticorpos antagonistas anti-NGF são conhecidos na técnica e descritos aqui.

Noutro aspeto, a invenção fornece utilizações médicas para a redução da incidência, o melhoramento, a supressão, a atenuação, e/ou o adiamento do começo, do desenvolvimento ou da progressão da dor de osteoartrite num indivíduo. Deste modo, em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado antes do desenvolvimento da dor ou de um episódio de dor num indivíduo com osteoartrite.

O diagnóstico ou estimativa da dor de osteoartrite está bem estabelecido na técnica. A estimativa pode ser efetuada com base em medidas conhecidas na técnica, tal como caracterização da dor do paciente utilizando várias escalas de dor. Consulte, por ex., Katz et al, *Surg Clin North Am.* (1999) 79 (2):231-52; Caraceni et al. *J Pain Symptom Manage* (2002) 23(3):239-55. Por exemplo, a Escala de Dor de Deambulação WOMAC (incluindo dor, ancilose, e função física) e a Escala Analógica Visual (VAS) de 100 mm podem ser utilizadas para estimar a dor e avaliar a resposta ao tratamento.

O anticorpo antagonista anti-NGF pode ser administrado

a um indivíduo através de qualquer via adequada. Os exemplos de vias de administração diferentes são aqui descritos.

O alívio da dor pode caracterizar-se pelo tempo de alívio. Por conseguinte, em algumas formas de realização, o alívio da dor é observado num prazo de cerca de 24 horas após a administração do anticorpo antagonista anti-NGF. Noutras formas de realização, o alívio da dor é observado num prazo de cerca de 36, 48, 60, 72 horas ou 4 dias após a administração do anticorpo antagonista anti-NGF. Em algumas formas de realização, a frequência e/ou intensidade da dor diminui, e/ou a qualidade de vida das pessoas que sofrem da doença aumenta.

A criação e utilização de anticorpos antagonistas anti-NGF para estes métodos são descritas nas secções abaixo ("Anticorpo antagonista anti-NGF"; "Identificação de anticorpos antagonistas anti-NGF"; "Administração de um anticorpo antagonista anti-NGF").

Anticorpo antagonista anti-NGF

As utilizações médicas da invenção (relacionadas com a dor de artrite reumatoide e a dor de osteoartrite) utilizam um anticorpo antagonista anti-NGF, que se refere a qualquer molécula de anticorpo que bloqueia, suprime ou reduz (incluindo significativamente) a atividade biológica de NGF, incluindo as vias a jusante mediadas pela sinalização de NGF, tais como a ligação de recetor e/ou dedução de uma resposta celular ao NGF.

Um anticorpo antagonista anti-NGF deve mostrar qualquer uma ou mais das seguintes características: (a) ligação ao NGF e inibição da atividade biológica de NGF ou das vias a jusante mediadas pela função de sinalização de NGF; (b) prevenção, melhoramento ou tratamento de qualquer aspeto da dor de artrite reumatoide ou dor de osteoartrite; (c) bloqueio ou diminuição da ativação de recetor NGF (incluindo dimerização e/ou autofosforilação do recetor

TrkA); (d) aumento do espaço livre do NGF; (e) inibição (redução) da síntese, produção ou libertação de NGF. Os anticorpos antagonistas anti-NGF são conhecidos na técnica, consulte, por ex., as Publicações PCT n.ºs WO 01/78698, WO 01/64247, as Patentes U.S. 5.844.092, 5.877.016, e 6.153.189; Hongo et al., *Hybridoma*, 19:215-227 (2000); *Cell. Molec. Biol.* 13:559-568 (1993); GenBank N.ºs de Acesso U39608, U39609, L17078 ou L17077.

Para efeitos desta invenção, o anticorpo reage com o NGF de um modo que inibe o NGF e/ou as vias a jusante mediadas pela função de sinalização de NGF. Em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF reconhece o NGF humano. Ainda noutras formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF liga especificamente o NGF humano. Em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF não liga significativamente às neurotrofinas relacionadas, tais como NT-3, NT4/5 e/ou BDNF. Noutras formas de realização ainda, o anticorpo anti-NGF é capaz de ligar o NGF e inibir eficazmente a ligação do NGF ao respetivo recetor TrkA e/ou p75 *in vivo* e/ou inibir eficazmente o NGF de ativar o respetivo recetor TrkA e/ou p75. Noutras formas de realização ainda, o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo monoclonal. Noutras formas de realização ainda, o anticorpo anti-NGF é humanizado (tal como o anticorpo E3 aqui descrito). Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é humano. Numa forma de realização, o anticorpo é um anticorpo humano que reconhece um ou mais epítomos no NGF humano. Noutra forma de realização, o anticorpo é um anticorpo de ratinho ou rato que reconhece um ou mais epítomos no NGF humano. Noutra forma de realização, o anticorpo reconhece um ou mais epítomos num NGF selecionado a partir do grupo que consiste em: primata, canino, felino, equino e bovino. Noutras formas de realização ainda, o anticorpo antagonista anti-NGF liga essencialmente o mesmo

epítopo NGF 6 como um anticorpo selecionado a partir de qualquer um ou mais dos seguintes: MAb 911, MAb 912 e MAb 938 (Consulte Hongo, et al., *Hybridoma* 19:215-227 (2000)). Noutras formas de realização, o anticorpo liga o mesmo epítopo como Mab 911. Noutra forma de realização, o anticorpo compreende uma região constante que é imunologicamente inerte (por ex., não aciona a lise mediada pelo complemento ou a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC)). A atividade ADCC pode ser estimada utilizando métodos divulgados na Patente U.S. 5.500.362. Em algumas formas de realização, a região constante é modificada conforme descrito em *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624; Pedido de Patente PCT n.º PCT/GB99/01441; e/ou Pedido de Patente UK 9809951.8.

Em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo monoclonal anti-NGF de ratinho humanizado denominado anticorpo "E3", qualquer um dos anticorpos relacionados E3 aqui descritos, ou quaisquer fragmentos dos mesmos, que sejam antagonistas de NGF.

Os anticorpos úteis na presente invenção podem abranger anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, fragmentos de anticorpo (por ex., Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticorpos quiméricos, anticorpos biespecíficos, anticorpos heteroconjugados, cadeia única (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão que compreendem uma porção de anticorpo, anticorpos humanizados, e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreende um local de reconhecimento do antigénio da especificidade requerida, incluindo variantes de glicosilação de anticorpos, variantes de sequência de aminoácidos de anticorpos, e anticorpos modificados de forma covalente. Os anticorpos podem ser murinos, de rato, humanos ou de qualquer outra origem (incluindo anticorpos quiméricos ou humanizados).

A afinidade de ligação de um anticorpo antagonista

anti-NGF ao NGF (tal como NGFh) pode ser de cerca de 0,10 a cerca de 0,80 nM, cerca de 0,15 a cerca de 0,75 nM e cerca de 0,18 a cerca de 0,72 nM. Numa forma de realização, a afinidade de ligação é entre cerca de 2 pM e 22 pM. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é de cerca de 10 nM. Noutras formas de realização, a afinidade de ligação é de cerca de 0,1 nM ou cerca de 0,07 nM. Noutras formas de realização, a afinidade de ligação é menos do que cerca de 0,1 nM ou menos do que cerca de 0,07 nM. Noutras formas de realização, a afinidade de ligação é qualquer valor de cerca de 1 nM, cerca de 500 pM, cerca de 100 pM, ou cerca de 50 pM a qualquer valor de cerca de 2 pM, cerca de 5 pM, cerca de 10 pM, cerca de 15 pM, cerca de 20 pM, ou cerca de 40 pM. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é qualquer valor de cerca de 1 nM, cerca de 500 pM, cerca de 100 pM, ou cerca de 50 pM, ou menos do que cerca de 50 pM. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é menos do que qualquer valor de cerca de 1 nM, cerca de 500 pM, cerca de 100 pM, ou cerca de 50 pM. Noutras formas de realização ainda, a afinidade de ligação é de cerca de 2 pM, cerca de 5 pM, cerca de 10 pM, cerca de 15 pM, cerca de 20 pM, cerca de 40 pM ou maior do que cerca de 40 pM.

Uma forma de determinar a afinidade de ligação de anticorpos ao NGF é medindo a afinidade de ligação de fragmentos Fab monofuncionais do anticorpo. Para obter fragmentos Fab monofuncionais, um anticorpo (por exemplo, IgG) pode ser clivado com papaína ou expressado de forma recombinante. A afinidade de um fragmento Fab anti-NGF de um anticorpo pode ser determinada pela ressonância de plasma de superfície (sistema de ressonância de plasma de superfície (SPR) BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ). Os chips CM5 podem ser ativados com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do

fornecedor. O NGF humano (ou qualquer outro NGF) pode ser diluído em 10 mM de acetato de sódio com pH 4,0 e injetado sobre o chip ativado numa concentração de 0,005 mg/mL. Mediante a utilização de tempo de fluxo variável através dos canais de chip individual, é possível alcançar dois intervalos de densidade de antigénio: 100 a 200 unidades de resposta (RU) para estudos cinéticos detalhados e 500 a 600 RU para ensaios de rastreio. O chip pode ser bloqueado com etanolamina. Os estudos de regeneração mostraram que uma mistura de tampão de eluição Pierce (Produto N.º 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) e 4 M NaCl (2:1) remove eficazmente o Fab ligado enquanto mantém a atividade de NGFh no chip durante mais de 200 injeções. O tampão HBS-EP (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% de Tensioativo P29) é utilizado como tampão contínuo para os ensaios BIAcore. As diluições em série (0,1-10x K_D estimada) de amostras Fab purificadas são injetadas durante 1 min em 100 μ L/min e são permitidos tempos de dissociação até 2 h. As concentrações das proteínas Fab são determinadas através de ELISA e/ou eletroforese SDS-PAGE utilizando um Fab de concentração conhecida (conforme determinado pela análise de aminoácidos) como padrão. As taxas de associação cinética (k_{on}) e as taxas de dissociação (k_{off}) são obtidas em simultâneo adaptando os dados a um modelo de ligação Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) utilizando o programa BIAevaluation. Os valores da constante de dissociação de equilíbrio (K_D) são calculados como k_{off}/k_{on} . Este protocolo é adequado para utilização na determinação da afinidade de ligação de um anticorpo a qualquer NGF, incluindo NGF humano, NGF de outro vertebrado (em algumas formas de realização, mamífero) (tal como NGF de ratinho, NGF de rato, NGF de primata), bem como para utilização com outras neurotrofinas, tais como as neurotrofinas relacionadas NT3,

NT4/5 e/ou BDNF.

Em algumas formas de realização, o anticorpo liga o NGF humano, e não liga significativamente um NGF de outra espécie vertebrada (em algumas formas de realização, mamífera). Em algumas formas de realização, o anticorpo liga o NGF humano, bem como um ou mais NGF de outra espécie vertebrada (em algumas formas de realização, mamífera). Noutras formas de realização ainda, o anticorpo liga o NGF e não reage significativamente de forma cruzada com outras neurotrofinas (tais como as neurotrofinas relacionadas, NT3, NT4/5 e/ou BDNF). Em algumas formas de realização, o anticorpo liga o NGF, bem como, pelo menos, uma outra neurotrofina. Em algumas formas de realização, o anticorpo liga a uma espécie mamífera do NGF, tal como um cavalo ou um cão, mas não liga significativamente o NGF de outra espécie mamífera.

Os epítomos podem ser contínuos ou descontínuos. Numa forma de realização, o anticorpo liga essencialmente os mesmos epítomos NGFh como um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em MAb 911, MAb 912 e MAb 938 conforme descrito em Hongo et al., *Hybridoma*, 19:215-227 (2000). Noutra forma de realização, o anticorpo liga essencialmente o mesmo epítomo NGFh como MAb 911. Noutra forma de realização ainda, o anticorpo liga essencialmente o mesmo epítomo como MAb 909. Hongo et al., supra. Por exemplo, o epítomo pode compreender um ou mais dos seguintes: resíduos K32, K34 e E35 na região variável 1 (aminoácidos 23 a 35) de NGFh; resíduos F79 e T81 na região variável 4 (aminoácidos 81 a 88) de NGFh; resíduos H84 e K88 na região variável 4; resíduo R103 entre a região variável 5 (aminoácidos 94 a 98) de NGFh e o C-terminal (aminoácidos 111 a 118) de NGFh; resíduo E11 na região pré-variável 1 (aminoácidos 10 a 23) de NGFh; Y52 entre a região variável 2 (aminoácidos 40 a 49) de NGFh e a região variável 3 (aminoácidos 59 a 66) de NGFh; resíduos L112 e

S113 no C-terminal de NGFh; resíduos R59 e R69 na região variável 3 de NGFh; ou resíduos V18, V20 e G23 na região pré-variável 1 de NGFh. Além disso, um epítipo pode compreender uma ou mais entre a região variável 1, região variável 3, região variável 4, região variável 5, a região de N-terminal, e/ou o C-terminal de NGFh. Noutra forma de realização ainda, o anticorpo reduz significativamente a acessibilidade do solvente do resíduo R103 de NGFh. Parte-se do princípio de que, embora os epítipos descritos acima estejam relacionados com o NGF humano, um perito na técnica pode alinhar as estruturas de NGF humano com o NGF de outra espécie e identificar possíveis equivalentes para estes epítipos.

Num aspeto, os anticorpos (por ex., humanos, humanizados, de ratinho, quiméricos) que podem inibir o NGF podem ser criados utilizando imunogénios que expressam a sequência completa ou parcial do NGF. Noutro aspeto, pode ser utilizado um imunogénio que compreende uma célula que sobre-expressa o NGF. Outro exemplo de um imunogénio que pode ser utilizado é a proteína NGF que contém o NGF completo ou uma porção da proteína NGF.

Os anticorpos antagonistas anti-NGF podem ser criados através de qualquer método conhecido na técnica. A via e o horário de imunização do animal hospedeiro estão geralmente em conformidade com as técnicas estabelecidas e convencionais para a estimulação e produção do anticorpo, conforme aqui descrito mais adiante. As técnicas gerais para produção de anticorpos humanos e de ratinho são conhecidas na técnica e são aqui descritas.

É esperado que qualquer indivíduo mamífero, incluindo seres humanos, ou anticorpo que produza células do mesmo possa ser manipulado para servir de base para a produção de linhas celulares de hibridoma mamíferas, incluindo humanas. Normalmente, o animal hospedeiro é inoculado via intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutânea,

intraplantar e/ou intradermal com uma quantidade de imunogénio, incluindo conforme aqui descrito.

Os hibridomas podem ser preparados a partir dos linfócitos e das células do mieloma imortalizadas utilizando a técnica de hibridização de células somáticas geral de Kohler, B. e Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497 ou conforme modificado por Buck, D. W., et al., *In Vitro*, 18:377-381 (1982). As linhas do mieloma disponíveis, incluindo, mas não se limitando a, X63-Ag8.653 e as do Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EUA, podem ser utilizadas na hibridização. Geralmente, a técnica implica a fusão de células do mieloma e células linfoides utilizando um fusogénio, tal como polietilenoglicol, ou através de meios elétricos bem conhecidos dos peritos na técnica. Após a fusão, as células são separadas do meio de fusão e desenvolvidas num meio de crescimento seletivo, tal como um meio de hipoxantina-aminoptericina-timidina (HAT), para eliminar as células principais não hibridizadas. Qualquer um dos meios aqui descritos, complementado com ou sem soro, pode ser utilizado para a cultura de hibridomas que segregam anticorpos monoclonais. Como outra alternativa à técnica de fusão de células, podem ser utilizadas células B imortalizadas EBV para produzir os anticorpos monoclonais anti-NGF da invenção exposta. Os hibridomas são expandidos e subclonados, se desejado, e os sobrenadantes são ensaiados relativamente à atividade anti-imunogénio através de procedimentos de imunoensaio convencionais (por ex., radioimunoensaio, imunoensaio de enzima ou imunoensaio de fluorescência).

Os hibridomas que podem ser utilizados como fonte de anticorpos abrangem todos os derivados, células progenitoras dos hibridomas principais que produzem anticorpos monoclonais específicos para o NGF, ou uma porção dos mesmos.

Os hibridomas que produzem esses anticorpos podem crescer *in vitro* ou *in vivo* utilizando procedimentos conhecidos. Os anticorpos monoclonais podem ser isolados dos meios de cultura ou fluidos corporais através de procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais, tais como precipitação de sulfato de amônio, eletroforese em gel, diálise, cromatografia e ultrafiltração, se desejado. A atividade não desejada, se presente, pode ser removida, por exemplo, deitando a preparação sobre os adsorventes feitos do imunogénio ligado a uma fase sólida e eluindo ou libertando os anticorpos desejados fora do imunogénio. A imunização de um animal hospedeiro com um NGF humano, ou um fragmento que contém a sequência de aminoácidos alvo conjugada com uma proteína que é imunogénica na espécie a ser imunizada, por ex., hemocianina de lapa californiana, soroalbumina, tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja utilizando um agente bifuncional ou de derivatização, por exemplo, éster maleimidobenzoil-sulfosuccinimida (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 ou $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, em que R e R_1 correspondem a grupos alquilo diferentes, pode produzir uma população de anticorpos (por ex., anticorpos monoclonais).

Se desejado, o anticorpo antagonista anti-NGF (monoclonal ou policlonal) de interesse pode ser sequenciado e a sequência de polinucleótidos pode ser então clonada num vetor para expressão ou propagação. A sequência que codifica o anticorpo de interesse pode ser mantida num vetor numa célula hospedeira e a célula hospedeira pode então ser expandida e congelada para utilização futura. Numa alternativa, a sequência de polinucleótidos pode ser utilizada para manipulação genética para "humanizar" o anticorpo ou melhorar a afinidade, ou outras

características do anticorpo. Por exemplo, a região constante pode ser manipulada, de modo a ficar mais parecida com as regiões constantes humanas, para evitar a resposta imunitária se o anticorpo for utilizado em tratamentos e experiências clínicas em seres humanos. Pode ser conveniente manipular geneticamente a sequência de anticorpos para obter uma maior afinidade do NGF e uma maior eficácia na inibição do NGF. Será evidente para um perito na técnica que podem ser efetuadas uma ou mais alterações de polinucleótidos no anticorpo antagonista anti-NGF mantendo a respetiva capacidade de ligação ao NGF.

Existem quatro etapas gerais para humanizar um anticorpo monoclonal. São elas: (1) a determinação do nucleótido e da sequência de aminoácidos prevista dos domínios variáveis leves e pesados do anticorpo inicial, (2) a conceção do anticorpo humanizado, ou seja, a decisão sobre qual a região de estrutura do anticorpo a utilizar durante o processo de humanização, (3) as metodologias/técnicas de humanização reais, e (4) a transfeção e expressão do anticorpo humanizado. Consulte, por exemplo, as Patentes U.S. 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; e 6.180.370.

Foram descritas diversas moléculas de anticorpo "humanizadas" que compreendem um local de ligação do antigénio derivado de uma imunoglobulina não humana, incluindo anticorpos quiméricos que contêm regiões V de roedor ou roedor modificado e respetivas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) associadas fundidas com domínios constantes humanos. Consulte, por exemplo, Winter et al. *Nature* 349:293-299 (1991), Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. EUA* 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. *J Immunol.* 138:4534-4538 (1987), e Brown et al. *Cancer Res.* 47:3577-3583 (1987). Outras referências descrevem CDRs de roedor enxertadas numa região de

estrutura (FR) de suporte humano antes da fusão com um domínio constante de anticorpo humano apropriado. Consulte, por exemplo, Riechmann et al. *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeyen et al. *Science* 239:1534-1536 (1988), e Jones et al. *Nature* 321:522-525 (1986). Outra referência descreve CDRs de roedor suportadas por regiões de estrutura de roedor revestidas de forma recombinante. Consulte, por exemplo, a Publicação de Patente europeia n.º 0519596. Estas moléculas "humanizadas" são concebidas para minimizar a resposta imunológica indesejada para as moléculas de anticorpo anti-humano de roedor, o que limita a duração e eficácia das aplicações terapêuticas dessas partes nos recipientes humanos. Por exemplo, a região constante de anticorpo pode ser manipulada de modo a ser imunologicamente inerte (por ex., não aciona a lise do complemento). Consulte, por ex., Publicação PCT/GB99/01441; Pedido de Patente UK 9809951.8. Outros métodos de humanização de anticorpos que também podem ser utilizados são divulgados por Daugherty et al., *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476 (1991), e nas Patentes U.S. 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; e 6.350.861; e na Publicação PCT n.º WO 01/27160.

Ainda noutra alternativa, os anticorpos totalmente humanos podem ser obtidos utilizando ratinhos disponíveis comercialmente que tenham sido manipulados para expressar proteínas de imunoglobulina humanas específicas. Os animais transgênicos concebidos para produzir uma resposta imunitária mais desejável (por ex., anticorpos totalmente humanos) ou mais forte também podem ser utilizados para a geração de anticorpos humanos ou humanizados. Os exemplos dessa tecnologia são Xenomouse™ da Abgenix, Inc. (Fremont, CA) e HuMAb-Mouse® e TC Mouse™ da Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

Numa alternativa, os anticorpos podem ser criados de forma recombinante e expressados utilizando qualquer método

conhecido na técnica. Noutra alternativa, os anticorpos podem ser criados de forma recombinante através da tecnologia de Phage Display (visualização de bacteriófagos). Consulte, por exemplo, as Patentes U.S. 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; e 6.265.150; e Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994). Em alternativa, a tecnologia de Phage Display (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990)) pode ser utilizada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpo *in vitro*, a partir de repertórios de genes de domínio (V) variável de imunoglobulina de dadores não imunizados. De acordo com esta técnica, os genes de domínio V de anticorpo são clonados *in-frame* num gene de proteína de revestimento maior ou menor de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd, e apresentados como fragmentos de anticorpo funcional na superfície da partícula do bacteriófago. Uma vez que a partícula filamentosa contém uma cópia de ADN de cadeia única do genoma do bacteriófago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo resultam igualmente na seleção do gene que codifica o anticorpo que mostra essas propriedades. Deste modo, o bacteriófago imita algumas das propriedades da célula B. A visualização de bacteriófagos pode ser efetuada numa variedade de formatos; para revisão consulte, por ex., Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). É possível utilizar diversas origens de segmentos de genes V para a visualização de bacteriófagos. Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) isolaram uma série diversa de anticorpos anti-oxazolona de uma pequena biblioteca combinatória e aleatória de genes V derivados dos baços de ratinhos imunizados. É possível construir um repertório de genes V de dadores humanos não imunizados e isolar os anticorpos para uma série diversa de antigénios (incluindo auto-antigénios), seguindo essencialmente as técnicas descritas por Mark et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-

597 (1991), ou Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Numa resposta imunitária natural, os genes do anticorpo acumulam mutações numa taxa elevada (hipermutação somática). Algumas das alterações introduzidas irão conferir uma afinidade mais alta, e as células B que apresentam imunoglobulina de superfície de alta afinidade são preferencialmente replicadas e diferenciadas durante o desafio dos antígenos subsequente. Este processo natural pode ser imitado utilizando a técnica conhecida como "mistura de cadeias". Marks, et al., *Bio/Technol.* 10:779-783 (1992)). Neste método, a afinidade dos anticorpos humanos "primários" obtidos através de visualização de bacteriófagos pode ser melhorada substituindo sequencialmente os genes de região V de cadeia pesada e leve por repertórios de variantes que ocorrem naturalmente (repertórios) de genes de domínio V obtidos a partir de doadores não imunizados. Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpo com afinidades no intervalo de pM-nM. Uma estratégia para criar repertórios de anticorpos de bacteriófagos muito grandes (igualmente conhecida como "a mãe de todas as bibliotecas") tem sido descrita por Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266 (1993). A mistura de genes também pode ser utilizada para derivar anticorpos humanos de anticorpos de roedor, em que o anticorpo humano tem afinidades e especificidades semelhantes em relação ao anticorpo de roedor inicial. De acordo com este método, que é referido igualmente como "impressão de epítopos", o gene de domínio V de cadeia pesada ou leve de anticorpos de roedor obtido através da técnica de Phage Display é substituído por um repertório de genes de domínio V humanos, criando quimeras de roedor-humanas. A seleção do antígeno resulta no isolamento de regiões variáveis humanas capazes de restaurar um local de ligação do antígeno funcional, ou seja, o epítipo determina (imprime) a escolha do parceiro. Quando o

processo é repetido para substituir o domínio V de roedor restante, é obtido um anticorpo humano (consulte a Publicação PCT n.º WO 93/06213, publicada a 1 de abril de 1993). Ao contrário da humanização tradicional de anticorpos de roedor através de enxerto com CDR, esta técnica fornece anticorpos completamente humanos, que não têm nenhuma estrutura nem resíduos CDR originários de roedor.

É evidente que, embora a descrição acima esteja relacionada com anticorpos humanizados, os princípios gerais descritos são aplicáveis na personalização dos anticorpos para serem utilizados, por exemplo, em cães, gatos, primatas, cavalos e bovinos. É ainda evidente que é possível combinar um ou mais aspectos da humanização de um anticorpo aqui descritos, por ex., enxerto com CDR, mutação de estrutura e mutação CDR.

Os anticorpos podem ser criados de forma recombinante, isolando primeiro os anticorpos e as células produtoras de anticorpos a partir de animais hospedeiros, obtendo a sequência de genes, e utilizando a sequência de genes para expressar o anticorpo de forma recombinante nas células hospedeiras (por ex., células CHO). Outro método que possa ser utilizado destina-se a expressar a sequência de anticorpos nas plantas (por ex., tabaco) ou no leite transgênico. Os métodos de expressão de anticorpos de forma recombinante em plantas ou leite foram divulgados. Consulte, por exemplo, Peeters, et al. *Vaccine* 19:2756 (2001); Lonberg, N. e D. Huszar *Int.Rev.Immunol* 13:65 (1995); e Pollock, et al., *J Immunol Methods* 231:147 (1999). Os métodos de criação de derivados de anticorpos, por exemplo, humanizados, de cadeia única, etc. são conhecidos na técnica.

Os imunoenaios e as técnicas de separação de citometria de fluxo, tal como separação de células ativadas por fluorescência (FACS), também podem ser utilizados para

isolar anticorpos que são específicos para o NGF.

Os anticorpos podem ser ligados a muitos portadores diferentes. Os portadores podem ser ativos e/ou inertes. Os exemplos de portadores bem conhecidos incluem polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilases, vidro, celuloses naturais e modificadas, poliacrilamidas, agaroses e magnetite. Para efeitos da invenção, a natureza do portador pode ser solúvel ou insolúvel. Os peritos na técnica conhecerão outros portadores adequados para a ligação de anticorpos, ou poderão verificá-los, utilizando experimentação de rotina. Em algumas formas de realização, o portador compreende uma parte que orienta o miocárdio.

O ADN que codifica os anticorpos monoclonais é prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (por ex., utilizando sondas de oligonucleótidos capazes de ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesadas e leves dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem de fonte preferida desse ADN. Depois de isolado, o ADN pode ser colocado nos vetores de expressão (tais como os vetores de expressão divulgados na Publicação PCT n.º WO 87/04462), que são depois transfetados nas células hospedeiras, tais como células *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células do mieloma que não produzem proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Consulte, por ex., a Publicação PCT n.º WO 87/04462. O ADN também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência de codificação para os domínios constantes de cadeias pesadas e leves humanas pelas sequências murinas homólogas, Morrison et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851 (1984), ou unindo de forma covalente à sequência de codificação de imunoglobulina toda ou parte da sequência de codificação para um polipéptido não

imunoglobulina. Deste modo, são preparados anticorpos "quiméricos" ou "híbridos" que têm a especificidade de ligação de um anticorpo monoclonal anti-NGF aqui.

Os anticorpos antagonistas anti-NGF podem ser caracterizados utilizando métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um método é identificar o epítipo ao qual é efetuada a ligação, ou "mapeamento do epítipo". Existem muitos métodos conhecidos na técnica de mapeamento e caracterização da localização dos epítipos nas proteínas, incluindo a resolução da estrutura cristalina de um complexo anticorpo-antigénio, ensaios de competição, ensaios de expressão de fragmentos de genes, e ensaios baseados em péptidos sintéticos, conforme descrito, por exemplo, no Capítulo 11 de Harlow and Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1999. Num exemplo adicional, o mapeamento de epítipos pode ser utilizado para determinar a sequência à qual um anticorpo antagonista anti-NGF liga. O mapeamento de epítipos está disponível comercialmente a partir de várias fontes, por exemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Baixos). O epítipo pode ser um epítipo linear, ou seja, contido numa única extensão de aminoácidos, ou um epítipo conformacional formado por uma interação tridimensional de aminoácidos que podem não estar necessariamente contidos numa única extensão. Os péptidos de comprimentos variáveis (por ex., pelo menos 4 a 6 aminoácidos de comprimento) podem ser isolados ou sintetizados (por ex., de forma recombinante) e utilizados para ensaios de ligação com um anticorpo antagonista anti-NGF. Noutro exemplo, o epítipo ao qual o anticorpo antagonista anti-NGF liga pode ser determinado num rastreio sistemático utilizando péptidos sobrepostos derivados da sequência NGF e determinando a ligação através do anticorpo antagonista anti-NGF. De acordo com os ensaios de expressão

de fragmentos do gene, a grelha de leitura aberta que codifica o NGF é fragmentada aleatoriamente ou através de construções genéticas específicas, e a reatividade dos fragmentos expressados de NGF com o anticorpo a ser testado é determinada. Por exemplo, os fragmentos do gene podem ser produzidos através de PCR e, em seguida, transcritos e traduzidos na proteína *in vitro*, na presença de aminoácidos radioativos. A ligação do anticorpo aos fragmentos de NGF rotulados de forma radioativa é então determinada pela imunoprecipitação e eletroforese em gel. Determinados epítomos podem ser igualmente identificados utilizando bibliotecas grandes de sequências de péptidos aleatórias apresentadas na superfície das partículas de bacteriófagos (bibliotecas de bacteriófagos). Em alternativa, uma biblioteca definida de fragmentos de péptidos sobrepostos pode ser testada relativamente à ligação ao anticorpo de teste em ensaios de ligação simples. Num exemplo adicional, é possível efetuar a mutagénese de um domínio de ligação do antigénio, as experiências de troca de domínios e a mutagénese de varrimento por alaninas para identificar os resíduos requeridos, suficientes e/ou necessários para a ligação de epítomos. Por exemplo, as experiências de troca de domínios podem ser efetuadas utilizando um NGF mutante no qual vários fragmentos do polipéptido NGF foram substituídos (trocados) por sequências de uma proteína intimamente relacionada, mas antigenicamente distinta (tal como outro membro da família de proteínas neurotrofinas). Ao estimar a ligação do anticorpo ao NGF mutante, é possível estimar a importância do fragmento de NGF específico para a ligação de anticorpos.

Ainda outro método que pode ser utilizado para caracterizar um anticorpo antagonista anti-NGF é a utilização de ensaios de competição com outros anticorpos conhecidos por ligarem ao mesmo antigénio, ou seja, vários fragmentos no NGF, para determinar se o anticorpo

antagonista anti-NGF liga ao mesmo epítipo como outros anticorpos. Os ensaios de competição são bem conhecidos dos peritos na técnica. Os exemplos de anticorpos que podem ser utilizados nos ensaios de competição para a presente invenção incluem MAb 911, 912, 938, conforme descrito em Hongo, et al., *Hybridoma* 19:215-227 (2000).

Um vetor de expressão pode ser utilizado para direcionar a expressão de um anticorpo antagonista anti-NGF. Um perito na técnica está familiarizado com a administração de vetores de expressão para obter a expressão de uma proteína exógena *in vivo*. Consulte, por ex., as Patentes U.S. 6.436.908; 6.413.942; e 6.376.471. A administração de vetores de expressão inclui administração local ou sistêmica, incluindo injeção, administração oral, administração por cateter ou bombardeamento de partículas e administração tópica. Noutra forma de realização, o vetor de expressão é administrado diretamente no gânglio ou tronco simpático, ou numa artéria coronária, aurícula, ventrículo ou pericárdio.

A ministração orientada de composições terapêuticas que contêm um vetor de expressão ou polinucleótidos subgenómicos também pode ser utilizada. As técnicas de ministração de ADN mediada pelo recetor são descritas em, por exemplo, Findeis et al., *Trends Biotechnol.* (1993) 11:202; Chiou et al., *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer* (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1988) 263:621; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1994) 269:542; Zenke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* (1990) 87:3655; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1991) 266:338. As composições terapêuticas que contêm um polinucleótido são administradas num intervalo de cerca de 100 ng a cerca de 200 mg de ADN para administração local num protocolo de terapia de genes. Os intervalos de concentração de cerca de 500 ng a cerca de 50 mg, cerca de 1 µg a cerca de 2 mg, cerca de 5 µg a cerca de 500 µg, e

cerca de μ 20 g a cerca de 100 μ g de ADN também podem ser utilizados durante um protocolo de terapia de genes. Os polipéptidos e polinucleótidos terapêuticos podem ser ministrados utilizando veículos de ministração de genes. O veículo de ministração de genes pode ser de origem viral ou não viral (consulte em geral, Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1994) 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy* (1994) 5:845; Connelly, *Human Gene Therapy* (1995) 1:185; e Kaplitt, *Nature Genetics* (1994) 6:148). A expressão dessas sequências de codificação pode ser induzida utilizando promotores heterólogos ou mamíferos endógenos. A expressão da sequência de codificação pode ser constitutiva ou regulada.

Os vetores virais para ministração de um polinucleótido desejado e de uma expressão numa célula desejada são bem conhecidos na técnica. Os veículos virais exemplares incluem, mas não se limitam a, retrovírus recombinantes (consulte, por ex., as Publicações PCT n.ºs WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; as Patentes U.S. 5.219.740 e 4.777.127; Patente GB 2.200.651; e Patente EP 0 345 242), vetores baseados em alfavírus (por ex., vetores de vírus Sindbis, vírus da floresta de Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), vírus Ross River (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) e vírus da encefalite equina venezuelana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), e vetores de vírus adeno-associados (AAV) (consulte, por ex., as Publicações PCT n.ºs WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 e WO 95/00655). A administração de ADN ligado a adenovírus inativado, conforme descrito em Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3:147, também pode ser utilizada.

Os métodos e veículos de ministração não virais também podem ser utilizados, incluindo, mas não se limitando a, ADN condensado policatiónico ligado ou não ligado ao

adenovírus inativado sozinho (consulte, por ex., Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3:147); ADN ligado ao ligando (consulte, por ex., Wu, *J. Biol. Chem.* (1989) 264:16985); células de veículos de ministração de células eucarióticas (consulte, por ex., Patente U.S. 5.814.482; Publicações PCT n.ºs WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; e WO 97/42338) e fusão ou neutralização de carga nucleica com membranas de células. O ADN nu também pode ser utilizado. Os métodos de introdução de ADN nu exemplares são descritos na Publicação PCT n.º WO 90/11092 e Patente U.S. 5.580.859. Os lipossomas que podem funcionar como veículos de ministração de genes são descritos na Patente U.S. 5.422.120; Publicações PCT n.ºs WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; e EP 0524968. As abordagens adicionais são descritas em Philip, *Mol. Cell Biol.* (1994) 14:2411, e em Woffendin, *Proc. Natl. Acad Sci.* (1994) 91:1581.

Identificação de anticorpos antagonistas anti-NGF

Os anticorpos antagonistas anti-NGF podem ser identificados ou caracterizados utilizando métodos conhecidos na técnica, em que a redução, o melhoramento ou a neutralização de uma atividade biológica de NGF são detetados e/ou medidos. Por exemplo, um ensaio de ativação de recetor quinase (KIRA) descrito nas Patentes U.S. 5.766.863 e 5.891.650 pode ser utilizado para identificar agentes anti-NGF. Este ensaio tipo ELISA é adequado para a medição qualitativa ou quantitativa de ativação de quinase, medindo a autofosforilação do domínio quinase de um recetor de proteína tirosina quinase (a seguir, "rPTK"), por ex., recetor TrkA, bem como para a identificação e caracterização de possíveis antagonistas de um rPTK selecionado, por ex., TrkA. A primeira fase do ensaio implica a fosforilação do domínio quinase de um recetor quinase, por exemplo, um recetor TrkA, em que o recetor está presente na membrana de uma célula eucariótica. O recetor pode ser um recetor endógeno, ou o ácido nucleico

que codifica o recetor, ou uma construção do recetor, pode ser transformado na célula. Normalmente, uma primeira fase sólida (por ex., um poço de uma placa de primeiro ensaio) é revestida com uma população substancialmente homogénea dessas células (habitualmente, uma linha celular mamífera), de modo a que as células adiram à fase sólida. Muitas vezes, as células são aderentes e, como tal, aderem naturalmente à primeira fase sólida. Se for utilizada uma "construção do recetor", esta compreende geralmente uma fusão de um recetor quinase e um polipéptido FLAG. O polipéptido FLAG é reconhecido pelo agente de captura, muitas vezes um anticorpo de captura, na parte ELISA do ensaio. Um analito, tal como um anticorpo antagonista anti-NGF candidato, é então adicionado em conjunto com o NGF aos poços que contêm as células aderentes, de modo a que o recetor tirosina quinase (por ex., recetor TrkA) seja exposto ao (ou colocado em contacto com) NGF e ao analito. Este ensaio permite a identificação de anticorpos que inibem a ativação de TrkA através do respetivo ligando NGF. A seguir à exposição ao NGF e ao analito, as células aderentes são solubilizadas utilizando um tampão de lise (que inclui um detergente de solubilização) e uma agitação suave, libertando assim o lisado de células que pode ser submetido à parte ELISA do ensaio diretamente, sem a necessidade de concentração ou clarificação do lisado de células.

O lisado de células assim preparado está então pronto para ser submetido à fase ELISA do ensaio. Como uma primeira etapa na fase ELISA, uma segunda fase sólida (habitualmente, um poço de uma placa de microtitulação ELISA) é revestida com um agente de captura (muitas vezes um anticorpo de captura) que liga especificamente ao recetor tirosina quinase ou, no caso de uma construção do recetor, ao polipéptido FLAG. O revestimento da segunda fase sólida é realizado de modo a que o agente de captura

adira à segunda fase sólida. Geralmente, o agente de captura é um anticorpo monoclonal, mas, conforme descrito nos exemplos aqui apresentados, os anticorpos policlonais também pode ser utilizados. O lisado de células obtido é então exposto a, ou colocado em contacto com, o agente de captura aderente, de modo a que o recetor ou construção do recetor adira à (ou seja capturado na) segunda fase sólida. Em seguida, é realizada uma etapa de lavagem, de modo a remover o lisado de células não ligadas, deixando o recetor ou construção do recetor capturado. O recetor ou construção do recetor capturado ou aderente é então exposto a, ou colocado em contacto com, um anticorpo anti-fosfotirosina que identifica resíduos de tirosina fosforilados no recetor tirosina quinase. Numa forma de realização, o anticorpo anti-fosfotirosina é conjugado (direta ou indiretamente) com uma enzima que catalisa uma alteração de cor de um reagente de coloração não radioativo. Por conseguinte, a fosforilação do recetor pode ser medida através de uma alteração de cor subsequente do reagente. A enzima pode ser ligada ao anticorpo anti-fosfotirosina diretamente, ou uma molécula de conjugação (por ex., biotina) pode ser conjugada com o anticorpo anti-fosfotirosina e a enzima pode ser subsequentemente ligada ao anticorpo anti-fosfotirosina através da molécula de conjugação. Finalmente, a ligação do anticorpo anti-fosfotirosina ao recetor ou construção do recetor capturado é medida, por ex., através de uma alteração de cor no reagente de coloração.

O anticorpo antagonista anti-NGF pode ser igualmente identificado através da incubação de um agente candidato com NGF e da monitorização de qualquer uma ou mais das seguintes características: (a) ligação ao NGF e inibição da atividade biológica de NGF ou das vias a jusante mediadas pela função de sinalização de NGF; (b) inibição, bloqueio ou diminuição da ativação de recetor NGF (incluindo

dimerização e/ou autofosforilação de TrkA); (c) aumento do espaço livre do NGF; (d) tratamento ou prevenção de qualquer aspeto da dor de artrite reumatoide ou dor de osteoartrite; (e) inibição (redução) da síntese, produção ou libertação de NGF. Em algumas formas de realização, um anticorpo antagonista anti-NGF é identificado através da incubação de um agente candidato com NGF e da monitorização da ligação e/ou neutralização ou redução associadas de uma atividade biológica de NGF. O ensaio de ligação pode ser efetuado com polipéptidos NGF purificados, ou com células que expressam naturalmente, ou são transfetadas para expressar, os polipéptidos NGF. Numa forma de realização, o ensaio de ligação é um ensaio de ligação competitiva, em que a capacidade de um anticorpo candidato para competir com um antagonista anti-NGF conhecido para ligação de NGF é avaliada. O ensaio pode ser efetuado em vários formatos, incluindo o formato ELISA. Noutras formas de realização, um anticorpo antagonista anti-NGF é identificado através da incubação de um agente candidato com NGF e da monitorização da ligação e inibição associada da dimerização e/ou autofosforilação do recetor trkA.

A seguir à identificação inicial, a atividade de um anticorpo antagonista anti-NGF candidato pode ser ainda confirmada e refinada através de bioensaios, conhecidos por testar as atividades biológicas orientadas. Em alternativa, os bioensaios podem ser utilizados para rastrear os candidatos diretamente. Por exemplo, o NGF provoca um número de alterações morfollogicamente reconhecíveis nas células recetivas. Estas incluem, mas não se limitam a, provocar a diferenciação de células PC12 e melhorar o crescimento dos neuritos a partir destas células (Greene et al., *Proc Natl Acad Sci EUA*. 73(7):2424-8, 1976), provocar o crescimento de neuritos a partir de explantes de gânglios simpáticos e sensoriais recetivos (Levi-Montalcini, R. e Angeletti, P. *Nerve growth factor. Physiol. Rev.* 48:534-

569, 1968) e provocar a sobrevivência de neurónios dependentes de NGF, tais como gânglio da raiz dorsal embrionário, gânglio trigeminal ou neurónios do gânglio simpático (por ex., Chun & Patterson, *Dev. Biol.* 75:705-711, (1977); Buchman & Davies, *Development* 118:989-1001 (1993). Deste modo, o ensaio para inibição de atividade biológica de NGF implica a cultura de células recetivas NGF com NGF mais um analito, tal como um anticorpo antagonista anti-NGF candidato. Depois de um tempo apropriado, será ensaiada a resposta de células (diferenciação de células, crescimento de neuritos ou sobrevivência de células).

A capacidade de um anticorpo antagonista anti-NGF candidato para bloquear ou neutralizar uma atividade biológica de NGF pode ser igualmente estimada através da monitorização da capacidade do agente candidato para inibir a sobrevivência mediada por NGF no bioensaio de sobrevivência dos gânglios da raiz dorsal de rato embrionários, conforme descrito em Hongo et al., *Hybridoma* 19:215-227 (2000).

Administração de um anticorpo antagonista anti-NGF

Um anticorpo antagonista anti-NGF pode ser administrado a um indivíduo (para artrite reumatoide e osteoartrite) através de uma via adequada. Deve ser evidente para um perito na técnica que os exemplos aqui descritos não pretendem ser limitativos, mas ilustrativos das técnicas disponíveis. Por conseguinte, em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado a um indivíduo de acordo com os métodos conhecidos, tal como administração intravenosa, por ex., como um bolo ou através de infusão contínua durante um período de tempo, por via intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, sublingual, intrassinovial, por insuflação, por via intratecal, oral, por inalação ou vias tópicas. A administração pode ser sistémica, por ex., administração

intravenosa, ou localizada. Os nebulizadores disponíveis comercialmente para formulações líquidas, incluindo nebulizadores de jato e nebulizadores ultrassônicos, são úteis para a administração. As formulações líquidas podem ser diretamente nebulizadas e o pó liofilizado pode ser nebulizado após a reconstituição. Em alternativa, o anticorpo antagonista anti-NGF pode ser aerossolizado utilizando uma formulação de fluorocarboneto e um inalador de dose calibrada, ou inalado como um pó liofilizado e moído.

Numa forma de realização, um anticorpo antagonista anti-NGF é administrado através de técnicas de ministração local orientada ou específica do local. Os exemplos de técnicas de ministração local orientada ou específica do local incluem várias fontes depot implantáveis do anticorpo antagonista anti-NGF ou cateteres de ministração local, tais como cateteres de infusão, um cateter interior, ou um cateter com agulha, enxertos sintéticos, túnicas adventícias, desvios e tubos ou outros dispositivos implantáveis, portadores específicos do local, injeção direta ou aplicação direta. Consulte, por ex., a Publicação PCT n.º WO 00/53211 e a Patente U.S. 5.981.568.

Várias formulações de um anticorpo antagonista anti-NGF podem ser utilizadas para a administração. Em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF pode ser administrado puro. Em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF e um excipiente farmacologicamente aceitável podem estar em várias formulações. Os excipientes farmacologicamente aceitáveis são conhecidos na técnica, e são substâncias relativamente inertes que facilitam a administração de uma substância farmacologicamente eficaz. Por exemplo, um excipiente pode fornecer forma ou consistência, ou funcionar como um diluente. Os excipientes adequados incluem, mas não se limitam a, agentes de estabilização; agentes de

humedecimento e emulsão, sais para osmolaridade variável, agentes de encapsulamento, tampões e intensificadores de penetração na pele. Os excipientes, bem como as formulações para ministração parentérica e não parentérica de fármaco, são apresentados em Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20^a Ed. Mack Publishing (2000).

Em algumas formas de realização, estes agentes são formulados para administração por injeção (por ex., via intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intramuscular, etc.). Por conseguinte, estes agentes podem ser combinados com veículos farmacologicamente aceitáveis, tais como salina, solução de Ringer, solução de dextrose e afins. O regime de dosagem específico, ou seja, dose, regulação do tempo e repetição, dependerá de cada indivíduo e do respetivo historial médico.

Um anticorpo anti-NGF pode ser administrado utilizando qualquer método adequado, incluindo por injeção (por ex., via intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intramuscular, etc.). Os anticorpos anti-NGF podem ser igualmente administrados através de inalação, conforme aqui descrito. Geralmente, para a administração de anticorpos anti-NGF, uma dosagem candidata inicial pode ser de cerca de 2 mg/kg. Para efeitos da presente invenção, uma dosagem diária normal pode variar entre cerca de 1 µg/kg e 3 µg/kg e 30 µg/kg e 300 µg/kg e 3 mg/kg, e 30 mg/kg e 100 mg/kg ou mais, dependendo dos factores mencionados acima. Por exemplo, um anticorpo anti-NGF pode ser administrado em cerca de 1 µg/kg, cerca de 10 µg/kg, cerca de 20 µg/kg, cerca de 50 µg/kg, cerca de 100 µg/kg, cerca de 200 µg/kg, cerca de 500 µg/kg, cerca de 1 mg/kg, ou cerca de 2 mg/kg. Para administrações repetidas durante diversos dias ou mais longas, dependendo da condição, o tratamento é prolongado até ocorrer uma supressão desejada dos sintomas ou até serem alcançados os níveis terapêuticos suficientes para reduzir a dor. Um regime de dosagem exemplar compreende a

administração de uma dose inicial de cerca de 2 mg/kg, seguida de uma dose de manutenção semanal de cerca de 1 mg/kg do anticorpo anti-NGF, ou seguida de uma dose de manutenção de cerca de 1 mg/kg semana sim, semana não. Contudo, outros regimes de dosagem podem ser úteis, dependendo do padrão de declínio farmacocinético que o médico deseja alcançar. Por exemplo, em algumas formas de realização, é contemplada a dosagem de uma a quatro vezes por semana. O progresso desta terapia é facilmente monitorizado por ensaios e técnicas convencionais. O regime de dosagem (incluindo os antagonistas NGF utilizados) pode variar ao longo do tempo.

Para efeitos da presente invenção, a dosagem apropriada de um anticorpo antagonista anti-NGF dependerá do anticorpo antagonista anti-NGF (ou composições do mesmo) utilizado, do tipo e gravidade da dor a ser tratada, se o agente é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, da terapia anterior, do historial clínico e resposta do paciente ao agente, e do discernimento do médico assistente. Normalmente, o clínico irá administrar um anticorpo antagonista anti-NGF até ser atingida uma dosagem que alcance o resultado desejado. A dose e/ou frequência podem variar durante o tratamento.

As considerações empíricas, tal como a meia vida, irão contribuir em geral para a determinação da dosagem. Por exemplo, os anticorpos que são compatíveis com o sistema imunitário humano, tais como anticorpos humanizados ou anticorpos totalmente humanos, podem ser utilizados para prolongar a meia vida do anticorpo e prevenir o anticorpo contra ataques do sistema imunitário do hospedeiro. A frequência de administração pode ser determinada e ajustada durante a terapia e geralmente, mas não necessariamente, baseia-se no tratamento, e/ou supressão, e/ou melhoramento, e/ou adiamento da dor. Em alternativa, as formulações de libertação contínua prolongada de anticorpos antagonistas

anti-NGF podem ser apropriadas. São conhecidas na técnica várias formulações e dispositivos para alcançar a libertação prolongada.

Numa forma de realização, as dosagens para um anticorpo antagonista anti-NGF podem ser determinadas empiricamente nos indivíduos que tenham recebido uma ou mais administrações de um anticorpo antagonista anti-NGF. Os indivíduos recebem dosagens incrementais de um anticorpo antagonista anti-NGF. Para estimar a eficácia de um anticorpo antagonista anti-NGF, pode ser seguido um indicador da dor.

A administração de um anticorpo antagonista anti-NGF de acordo com o método na presente invenção pode ser contínua ou não contínua, dependendo, por exemplo, da condição fisiológica do recipiente, independentemente de a finalidade da administração ser terapêutica ou profilática, e de outros fatores conhecidos dos médicos. A administração de um anticorpo antagonista anti-NGF pode ser essencialmente contínua durante um período de tempo pré-selecionado ou pode ser numa série de doses espaçadas, por ex., antes, durante ou após o desenvolvimento da dor; antes; durante; antes e após; durante e após; antes e durante; ou antes, durante e após o desenvolvimento da dor.

Em algumas formas de realização, pode estar presente mais de um anticorpo antagonista anti-NGF. Pelo menos um, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco diferentes, ou mais anticorpos antagonistas anti-NGF podem estar presentes. Geralmente, esses anticorpos antagonistas anti-NGF têm atividades complementares que não se afetam adversamente umas às outras.

As formulações terapêuticas do anticorpo antagonista anti-NGF utilizadas de acordo com a presente invenção são preparadas para armazenamento misturando um anticorpo com o grau desejado de pureza com estabilizadores, excipientes ou

portadores farmacêuticamente aceitáveis opcionais (Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20^a Ed. Mack Publishing (2000)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os estabilizadores, excipientes ou portadores aceitáveis não são tóxicos para os recipientes nas dosagens e concentrações utilizadas, e podem compreender tampões, tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; sais, tal como cloreto de sódio; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tal como cloreto de octadecildimetilbenzilamônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; álcool fenólico, butílico ou benzílico; parabenos de alquilo, tal como parabenos de metilo ou propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como soroalbumina, gelatina ou imunoglobulina; polímeros hidrófilos, tal como polivinilpirrolidona; ácidos de amina, tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes de quelação, tal como EDTA; açúcares, tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contrações de formação de sal, tal como sódio; complexos de metal (por ex., complexos de Zn-proteína) e/ou tensoativos não iónicos, tais como TWEENTM, PLURONICSTM ou polietilenoglicol (PEG).

Os lipossomas que contêm o anticorpo antagonista anti-NGF são preparados através de métodos conhecidos na técnica, conforme descrito em Epstein, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 82:3688 (1985); Hwang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 77 4030 (1980); e Patentes U.S. 4.485.045 e 4.544.545. Os lipossomas com tempo de circulação melhorado são divulgados na Patente U.S. 5.013.556. Os lipossomas particularmente úteis podem ser gerados através do método

de evaporação de fase inversa com uma composição de lípidos que compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada de PEG (PEG-PE). Os lipossomas são obtidos por extrusão através de filtros de tamanho de poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado.

Os ingredientes ativos podem ser igualmente apanhados em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de amontoamento ou através de polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de gelatina ou hidroximetilcelulose e microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, em sistemas de ministração de fármaco coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Estas técnicas são divulgadas em Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20^a Ed. Mack Publishing (2000).

As preparações de libertação prolongada podem ser preparadas. Os exemplos adequados de preparações de libertação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contêm o anticorpo, em que as matrizes estão na forma de artigos moldados, por ex. películas, ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de libertação prolongada incluem poliésteres, hidrogeles (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(álcool vinílico)), poliláticos (Patente U.S. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e 7 etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinil não degradável, copolímeros de ácido lático-ácido glicólico degradáveis, tal como LUPRON DEPOT TM (microesferas injetáveis compostas por copolímero de ácido lático-ácido glicólico e acetato de leuprolida), isobutirato de acetato e sacarose, e poli-D-(-)-3-ácido hidroxibutírico.

As formulações a utilizar para a administração *in vivo* têm de ser estéreis. Isto é prontamente realizado, por

exemplo, mediante filtração através das membranas de filtração estéreis. As composições de anticorpo antagonista anti-NGF terapêuticas são geralmente colocadas num recipiente com uma porta de acesso estéril, por exemplo, um frasco ou bolsa de solução intravenosa que contém um tampão perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

As composições de acordo com a presente invenção podem ser em formas de dosagem unitária, tais como pastilhas, comprimidos, cápsulas, pós, grânulos, soluções ou suspensões, em supositórios, para administração oral, parenteral ou retal, ou administração por inalação ou insuflação.

Para preparar composições sólidas, tais como pastilhas, o ingrediente ativo principal é misturado com um portador farmacêutico, por ex., ingredientes de pastilhas convencionais, tais como amido de milho, lactose, sacarose, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio, fosfato dicálcico ou gomas, e outros diluentes farmacêuticos, por ex. água, para formar uma composição pré-formulação sólida com uma mistura homogênea de um composto da presente invenção, ou um sal farmaceuticamente aceitável não tóxico do mesmo. Ao fazer referência a estas composições pré-formulação como homogêneas, significa que o ingrediente ativo é dispersado uniformemente por toda a composição, de modo a que a composição possa ser prontamente subdividida em formas de dosagem unitária igualmente eficazes, tais como pastilhas, comprimidos e cápsulas. Em seguida, esta composição pré-formulação sólida é subdividida em formas de dosagem unitária do tipo descrito acima que contém entre 0,1 e cerca de 500 mg do ingrediente ativo da presente invenção. As pastilhas ou comprimidos da nova composição podem ser revestidos ou combinados de outro modo para fornecer uma forma de dosagem que conceda a vantagem da ação prolongada. Por exemplo, a pastilha ou comprimido pode compreender um componente de

dosagem interior e um componente de dosagem exterior, o segundo estando na forma de um envelope sobre o primeiro. O dois componentes podem ser separados por uma camada entérica que serve para resistir à desintegração no estômago e permite que o componente interior entre intacto no duodeno ou seja atrasado na libertação. É possível utilizar uma variedade de materiais para essas camadas entéricas ou revestimentos, esses materiais incluindo uma diversidade de ácidos poliméricos e misturas de ácidos poliméricos com esses materiais, tais como goma-laca, álcool cetílico e acetato de celulose.

Os agentes tensioativos adequados incluem, em particular, agentes não iônicos, tais como polioxietileno-sorbitanos (por ex., TweenTM 20, 40, 60, 80 ou 85) e outros sorbitanos (por ex., SpanTM 20, 40, 60, 80 ou 85). As composições com um agente tensioativo irão compreender convenientemente entre 0,05 e 5% de agente tensioativo, e podem ser entre 0,1 e 2,5%. Será óbvio que podem ser adicionados outros ingredientes, por exemplo, manitol ou outros veículos farmacêuticamente aceitáveis, se necessário.

As emulsões adequadas podem ser preparadas utilizando emulsões de gordura disponíveis comercialmente, tais como Int-alipidTM, LiposynTM, InfonutrolTM, LipofundinTM e LipiphysanTM. O ingrediente ativo pode ser dissolvido numa composição de emulsão pré-mistura ou, em alternativa, pode ser dissolvido num óleo (por ex. óleo de soja, óleo de cártamo, óleo de semente de algodão, óleo de sésamo, óleo de milho ou óleo de amêndoa) e numa emulsão formada na mistura com um fosfolípido (por ex., fosfolípidos de ovo, fosfolípidos de soja ou lecitina de soja) e água. Será óbvio que podem ser adicionados outros ingredientes, por exemplo, glicerol ou glicose, para ajustar a tonicidade da emulsão. Normalmente, as emulsões adequadas irão conter até 20% de óleo, por exemplo, entre 5 e 20%. A emulsão de

gordura pode compreender gotículas de gordura entre 0,1 e 1,0 μm , em particular, 0,1 e 0,5 μm , e ter um pH entre 5,5 e 8,0.

As composições de emulsão podem ser preparadas através da mistura de um anticorpo de fator de crescimento do nervo com Intralipid™ ou os componentes do mesmo (óleo de soja, fosfolípidos de ovo, glicerol e água).

As composições para inalação ou insuflação incluem soluções e suspensões em solventes aquosos ou orgânicos farmacologicamente aceitáveis, ou misturas dos mesmos, e pós. As composições líquidas ou sólidas podem conter excipientes farmacologicamente aceitáveis adequados conforme apresentado acima. Em algumas formas de realização, as composições são administradas pela via respiratória nasal ou oral para um efeito local ou sistêmico. As composições em solventes farmacologicamente aceitáveis preferencialmente estéreis podem ser nebulizadas através da utilização de gases. As soluções nebulizadas podem ser respiradas diretamente a partir do dispositivo de nebulização ou o dispositivo de nebulização pode ser unido a uma máscara, mecha ou máquina de respiração de pressão positiva intermitente. As composições de solução, suspensão ou pó podem ser administradas, preferencialmente por via oral ou nasal, a partir de dispositivos que ministram a formulação de um modo apropriado.

A eficácia do tratamento pode ser estimada através de métodos bem conhecidos na técnica.

KITS QUE COMPREENDEM ANTICORPOS E POLINUCLEÓTIDOS DA INVENÇÃO

A invenção fornece igualmente kits que compreendem anticorpos ou polipéptidos para utilização na detecção e/ou terapia. Por conseguinte, em algumas formas de realização, os kits compreendem um anticorpo E3. Em algumas formas de realização, o kit compreende qualquer anticorpo ou polipéptido aqui descrito.

Noutros aspetos, os kits podem ser utilizados para qualquer um dos métodos aqui descritos, incluindo, por exemplo, para tratar um indivíduo com dor (incluindo dor pós-cirúrgica, dor de artrite reumatoide e dor de osteoartrite). Os kits desta invenção estão numa embalagem adequada e podem fornecer opcionalmente componentes adicionais, tais como tampões e instruções de utilização do anticorpo em qualquer um dos métodos aqui descritos. Em algumas formas de realização, os kits incluem instruções para tratamento da dor. Em algumas formas de realização, o kit compreende um anticorpo antagonista anti-NGF aqui descrito e instruções para o tratamento e/ou prevenção da dor de artrite reumatoide num indivíduo. Noutras formas de realização, o kit compreende um anticorpo antagonista anti-NGF aqui descrito e instruções para o tratamento e/ou prevenção da dor de osteoartrite num indivíduo. Em algumas das formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo E3.

Noutro aspeto, a invenção fornece kits que compreendem um polinucleótido que codifica um polipéptido E3 conforme aqui descrito. Em algumas formas de realização, os kits compreendem ainda instruções de utilização do polinucleótido em qualquer um dos métodos aqui descritos.

MÉTODOS DE AJUSTE DA AFINIDADE DE UM ANTICORPO E MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DE UMA CDR

Foi desenvolvido um novo método de caracterização de uma CDR de um anticorpo e/ou de alteração (tal como melhora) da afinidade de ligação de um polipéptido, tal como um anticorpo, denominado "mutagénesse de varrimento por bibliotecas". Geralmente, a mutagénesse de varrimento por bibliotecas funciona conforme apresentado em seguida. Uma ou mais posições de aminoácido na CDR são substituídas por dois ou mais (tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20) aminoácidos utilizando métodos reconhecidos na técnica. Isto gera bibliotecas

pequenas de clones (em algumas formas de realização, uma para cada posição de aminoácido analisada), cada uma com uma complexidade de dois ou mais membros (se dois ou mais aminoácidos forem substituídos em cada posição). Em geral, a biblioteca inclui igualmente um clone que compreende o aminoácido nativo (não substituído). Um número pequeno de clones, por ex., cerca de 20 a 80 clones (dependendo da complexidade da biblioteca), de cada biblioteca é rastreado relativamente à afinidade de ligação ao polipéptido alvo, e são identificados os candidatos com ligação maior, igual, menor ou sem ligação. Os métodos de determinação da afinidade de ligação são bem conhecidos na técnica. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é determinada utilizando a análise de ressonância de plasma de superfície BIAcore, que deteta diferenças na afinidade de ligação de cerca de 2 dobras ou mais. BIAcore é particularmente útil quando o anticorpo inicial já efetua a ligação com uma afinidade relativamente alta, por exemplo uma K_D de cerca de 10 nM ou menos. O rastreio utilizando a ressonância de plasma de superfície BIAcore é aqui descrito nos Exemplos.

Noutras formas de realização, a afinidade de ligação é determinada utilizando Biosensor Kinexa, ensaios de proximidade de cintilação, ELISA, imunoensaio ORIGEN (IGEN), extinção de fluorescência, transferência de fluorescência e/ou visualização da levedura. Noutras formas de realização, a afinidade de ligação é rastreada utilizando um bioensaio adequado.

Em algumas formas de realização, cada posição de aminoácido numa CDR é substituída (em algumas formas de realização, uma de cada vez) por todos os 20 aminoácidos naturais que utilizam métodos de mutagénese reconhecidos na técnica (alguns dos quais são aqui descritos). Isto gera bibliotecas pequenas de clones (em algumas formas de realização, uma para cada posição de aminoácido analisada),

cada uma com uma complexidade de 20 membros (se todos os 20 aminoácidos forem substituídos em cada posição).

Em algumas formas de realização, a biblioteca a ser rastreada compreende substituições em duas ou mais posições, o que pode ser na mesma CDR ou em duas ou mais CDRs. Deste modo, em algumas formas de realização, a biblioteca compreende substituições em duas ou mais posições numa CDR. Noutras formas de realização, a biblioteca compreende substituições em duas ou mais posições em duas ou mais CDRs. Noutras formas de realização ainda, a biblioteca compreende substituições em 3, 4, 5 ou mais posições, em que as referidas posições se encontram em duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs. Em algumas formas de realização, a substituição é preparada utilizando códons de baixa redundância. Consulte, por ex., a Tabela 2 de Balint et al., (1993) *Gene* 137(1):109-18).

Em algumas formas de realização, a CDR é CDRH3 e/ou CDRL3. Noutras formas de realização, a CDR é uma ou mais entre CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 e/ou CDRH3. Em algumas formas de realização, a CDR é uma CDR de Kabat, uma CDR de Chothia ou uma CDR alargada.

Os candidatos com ligação melhorada podem ser sequenciados, identificando assim um mutante de substituição de CDR que resulta numa afinidade melhorada (denominada igualmente substituição "melhorada"). Por exemplo, conforme demonstrado no Exemplo 1, a utilização deste método permitiu a identificação de uma única substituição que melhorou a ligação, mesmo quando as estimadas 18 outras substituições na mesma posição de aminoácido não resultaram em nenhuma ligação (ou seja, perda de função do anticorpo). Os candidatos que efetuam ligação também podem ser sequenciados, identificando assim uma substituição de CDR que mantém a ligação.

Em algumas formas de realização, são realizados múltiplas séries de rastreio. Por exemplo, os candidatos

(cada um compreendendo uma substituição de aminoácido numa ou mais posições de uma ou mais CDRs) com ligação melhorada são igualmente úteis para a conceção de uma segunda biblioteca com, pelo menos, o aminoácido original e substituído em cada posição CDR melhorada (ou seja, a posição de aminoácido na CDR na qual um mutante de substituição mostrou uma ligação melhorada). A preparação e o rastreio ou seleção desta biblioteca são descritos mais abaixo.

A mutagénesse de varrimento por bibliotecas fornece igualmente um meio de caracterização de uma CDR, de modo a que a frequência de clones com ligação melhorada, a mesma ligação, menor ligação ou sem ligação também forneça informações relacionadas com a importância de cada posição de aminoácido para a estabilidade do complexo anticorpo-antígeno. Por exemplo, se uma posição da CDR mantiver a ligação depois de alterada para todos os 20 aminoácidos, essa posição é identificada como uma posição sem probabilidade de ser requerida para a ligação do antígeno. Reciprocamente, se uma posição de CDR mantiver a ligação apenas numa pequena percentagem de substituições, essa posição é identificada como uma posição importante para a função CDR. Deste modo, os métodos de mutagénesse de varrimento por bibliotecas geram informações relacionadas com posições nas CDRs que podem ser alteradas para muitos aminoácidos diferentes (incluindo todos os 20 aminoácidos), e a posições nas CDRs que não podem ser alteradas ou que apenas podem ser alteradas para poucos aminoácidos. Este aspeto é descrito e exemplificado no Exemplo 1.

Em algumas formas de realização, os candidatos com afinidade melhorada são combinados numa segunda biblioteca, o que inclui o aminoácido melhorado, o aminoácido original nessa posição, e pode ainda incluir substituições adicionais nessa posição, dependendo da complexidade da biblioteca desejada ou permitida utilizando o método de

seleção ou rastreamento desejado. Além disso, se desejado, a posição de aminoácido adjacente pode ser selecionada aleatoriamente para, pelo menos, dois ou mais aminoácidos. A seleção aleatória de aminoácidos adjacentes pode permitir flexibilidade conformacional adicional na CDR mutante, o que pode, como consequência, permitir ou facilitar a introdução de um número maior de mutações que melhoram. Em algumas formas de realização, a biblioteca compreende igualmente a substituição nas posições que não mostraram afinidade melhorada na primeira série de rastreamento.

A segunda biblioteca é rastreada ou selecionada relativamente a membros da biblioteca com afinidade de ligação melhorada e/ou alterada utilizando qualquer método conhecido na técnica, incluindo o rastreamento utilizando a análise de ressonância de plasma de superfície BIAcore, e a seleção utilizando qualquer método conhecido na técnica relativamente à seleção, incluindo visualização de bacteriófagos, visualização da levedura e visualização de ribossomas.

Vantagens dos métodos de ajuste da afinidade de um anticorpo e caracterização de uma CDR

Os métodos são úteis para o pré-rastreamento das posições de aminoácidos de CDR para identificar substituições de aminoácidos que melhorem a ligação ou mantenham a ligação. A pré-identificação de resíduos importantes, a substituição que melhora a ligação e/ou as substituições que mantêm a função do anticorpo permitem uma concepção e um rastreamento eficazes de uma biblioteca de maturação de afinidade.

O presente método é igualmente útil para caracterizar uma CDR, e fornece informações abrangentes relativamente à importância de cada posição de aminoácido numa CDR para a ligação ao antígeno. O presente método também pode ser utilizado para identificar substituições que melhorem a ligação.

A utilização de bibliotecas pequenas, nas quais cada

posição pode ser selecionada aleatoriamente (em algumas formas de realização, uma de cada vez), permite o rastreamento de mutantes de substituição utilizando métodos precisos, tal como BIAcore, que fornecem informações cinéticas detalhadas. Geralmente, os métodos de rastreamento são impraticáveis quando são rastreadas bibliotecas maiores. Em vez disso, os métodos de seleção, tais como visualização de bacteriófagos, visualização da levedura e visualização de ribossomas, são utilizados habitualmente para identificar clones que mantêm a ligação. A visualização de bacteriófagos e os ensaios ELISA podem depender fortemente da concentração da amostra de proteína preparada a partir do clone e, deste modo, têm tendência para ter um profundo preconceito em relação aos clones que têm maior expressão, maior estabilidade ou menor toxicidade, em vez de identificarem os clones com maior afinidade de ligação. Além disso, as diferenças no nível de expressão dos clones podem ocultar pequenas melhoras na afinidade de ligação. Estas desvantagens são particularmente graves quando é utilizado um anticorpo com afinidade de ligação alta como material inicial, uma vez que têm de ser utilizados níveis muito baixos de antígeno para o rastreamento ser suficientemente rigoroso.

Em contraste, os métodos da invenção, tal como a seleção aleatória em cada posição (em algumas formas de realização, uma posição de cada vez), permitem a introdução e caracterização do efeito da substituição de, por exemplo, todos os 20 aminoácidos numa determinada posição. Esta análise fornece informações relativamente à quantidade de substituições tolerada numa determinada posição (ou seja, a manutenção da ligação de anticorpo) e fornece informações relacionadas com a importância de cada aminoácido para a função do anticorpo. Além disso, as substituições que resultam numa ligação melhorada podem ser identificadas, mesmo em circunstâncias nas quais muitas ou a maioria das

substituições numa determinada posição produzam anticorpos não funcionais (sem ligação). Em contraste, a mutagênese de varrimento por alaninas, que é utilizada geralmente para identificar posições CDR importantes, fornece informações relacionadas com o fato de a substituição de alanina permitir ou prevenir a ligação. De um modo geral, as posições nas quais uma substituição de alanina previne a ligação são removidas da biblioteca de maturação de afinidade. Contudo, em muitos casos, a alanina pode ser um substituto fraco na posição CDR.

Os presentes métodos permitem igualmente a identificação e caracterização do efeito de mutações de uma única CDR. Em contraste, os métodos, tal como a visualização de bacteriófagos, introduzem e selecionam muitas mutações em simultâneo e, deste modo, aumentam potencialmente o risco de as mutações positivas serem ocultadas pela presença de uma mutação prejudicial existente num clone específico.

Os presentes métodos são igualmente úteis para melhorar a afinidade enquanto mantêm a especificidade de ligação do anticorpo original (inicial), de modo a que os métodos presentes permitam a identificação de números pequenos de mutações (por ex., 1, 2, 3, 4 ou 5 mutações numa única CDR) que resultem em afinidade de ligação melhorada. Em contraste, os métodos, tal como a visualização de bacteriófagos, melhoram normalmente a afinidade de ligação utilizando múltiplas mutações de uma vez, o que pode resultar na mudança da especificidade do anticorpo e/ou no aumento da reatividade cruzada indesejada.

Os exemplos seguintes são fornecidos para ilustrar e não para limitar a invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: humanização e maturação de afinidade do anticorpo antagonista anti-NGF de ratinho 911

A. Métodos gerais

Os seguintes métodos gerais foram utilizados neste exemplo.

Geração de bibliotecas

As bibliotecas foram geradas por mutagênese de cassette PCR com oligonucleótidos degenerados conforme descrito em Kay et al. (1996), *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*, San Diego, Academic Press (consulte as págs. 277 a 291). O codão de dopagem NNK foi utilizado para selecionar aleatoriamente uma posição de aminoácido para incluir 20 possíveis aminoácidos. Para selecionar aleatoriamente uma posição de aminoácido para incluir apenas um subconjunto de aminoácidos com propriedades específicas, os codões de dopagem foram utilizados conforme descrito em Balint et al, (1993) *Gene* 137(1):109-18). A mutagênese direcionada para o local foi efetuada utilizando PCR recombinante conforme descrito em Innis et al, (1990) *PCR protocols: A guide to methods and applications* (consulte as págs. 177 a 183).

Preparação de Fab em pequena escala

A expressão em pequena escala em placas de 96 poços foi otimizada para rastrear bibliotecas de Fab. A começar pela *E. coli* transformada com uma biblioteca de Fab, foram escolhidas colônias para inocular uma placa principal (ágar LB + Ampicilina (50 µg/ml) + 2% Glicose) e uma placa de trabalho (2 ml/poço, 96 poços/placa com 1,5 mL de LB + Ampicilina (50 µg/ml) + 2% Glicose). Ambas as placas desenvolveram-se a 30 °C durante 8 a 12 horas. A placa principal foi armazenada a 4 °C e as células da placa de trabalho foram peletizadas a 5000 rpm e ressuspensas com 1 mL de LB+Ampicilina (50 µg/ml)+ 1 mM IPTG para induzir a expressão de Fabs. As células foram colhidas através de centrifugação após 5 h de tempo de expressão a 30 °C e, em seguida, ressuspensas em 500 µL de tampão HBS-EP (tampão HEPES de 100 mM, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005% P20, 3 mM

EDTA). A lise de células ressuspensas HBS-EP foi obtida por um ciclo de congelamento ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) seguido de descongelamento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os lisados de células foram centrifugados a 5000 rpm durante 30 min para separar os restos de células dos sobrenadantes que contêm Fabs. Em seguida, os sobrenadantes foram injetados no aparelho de ressonância de plasma BIAcore para obter as informações de afinidade de cada Fab. Os clones que expressam Fabs foram resgatados da placa principal para sequenciar o ADN e para produção de Fab em grande escala e caracterização detalhada, conforme descrito abaixo.

Preparação de Fab em grande escala

Para obter parâmetros cinéticos detalhados, os Fabs foram expressados e purificados a partir de grandes culturas. Os frascos Erlenmeyer com 200 mL de LB+Ampicilina ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$) + 2% Glicose foram inoculados com 5 mL de cultura noturna de um clone E. coli que expressa Fab selecionado. Os clones foram incubados a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ até um $\text{OD}_{550\text{nm}}$ de 1,0 ser obtido e, em seguida, induzido através da substituição dos meios para 200 ml, de LB+Ampicilina ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$) + 1 mM IPTG. Após 5 h de tempo de expressão a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, as células foram peletizadas através de centrifugação e, em seguida, ressuspensas em 10 mL PBS (pH 8). A lise das células foi obtida por dois ciclos de congelamento/descongelamento (a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente). O sobrenadante dos lisados de células foi carregado nas colunas de sefarose de superfluxo Ni-NTA (Qiagen, Valencia, CA) equilibradas com PBS, pH 8 e, em seguida, lavado com 5 volumes de coluna de PBS, pH 8. Os Fabs individuais foram eluídos em frações diferentes com PBS (pH 8) + 300 mM Imidazol. As frações que contêm Fabs foram reunidas e dialisadas no PBS e, em seguida, quantificadas através de ELISA antes da caracterização de afinidade.

Preparação de anticorpo inteiro

Para a expressão de anticorpos inteiros, foram clonadas regiões variáveis de cadeia pesada e leve em 2 vetores de expressão mamífera (Eb.911.E3 ou Eb.pur.911.3E para cadeia leve e Db.911.3E para cadeia pesada; aqui descrito) e transfetadas utilizando lipofetamina em células HEK 293 para expressão transitória. Os anticorpos foram purificados utilizando proteína A utilizando métodos padrão.

Ensaio Biacore

As afinidades de anticorpos monoclonais e Fabs anti-NGF foram determinadas utilizando o sistema de ressonância de plasma de superfície (SPR) BIAcore3000™ (BIAcore, INC, Piscaway NJ). Os chips CM5 foram ativados com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. O NGF humano foi diluído em 10 mM de acetato de sódio com pH 4,0 e injetado sobre o chip ativado numa concentração de 0,005 mg/mL. Mediante a utilização de tempo de fluxo variável através dos canais de chip individual, foram alcançados dois intervalos de densidade de antigénio: 100 a 200 unidades de resposta (RU) para estudos cinéticos detalhados e 500 a 600 RU para ensaios de rastreio. O chip foi bloqueado com etanolamina. Os estudos de regeneração mostraram que uma mistura de tampão de eluição Pierce (Produto N.º 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) e 4 M NaCl (2:1) removeu eficazmente o Fab ligado ao mesmo tempo que mantém a atividade de NGFh no chip durante mais de 200 injeções. O tampão HBS-EP (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% de Tensioativo P29) foi utilizado como tampão contínuo para todos os ensaios BIAcore.

Ensaio de rastreio

Um ensaio BIAcore de rastreio foi otimizado para determinar a afinidade de clones Fab de bibliotecas. Os sobrenadantes de lisados de cultura pequena foram injetados em 50 µl/min durante 2 min. Os tempos de dissociação de 10

a 15 minutos foram utilizados para a determinação de uma única taxa de dissociação exponencial (k_{off}) utilizando software BIAevaluation. As amostras que mostraram taxas k_{off} no mesmo intervalo do modelo utilizado para criar a biblioteca (clone 8L2-6D5, k_{off} $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) foram injetadas para confirmação e foram permitidos tempos de dissociação até 45 min para obter valores k_{off} melhores. Os clones que mostram valores k_{off} melhorados (mais lentos) foram expressados em grande escala e os parâmetros cinéticos inteiros, k_{on} e k_{off} , foram determinados na proteína purificada. O ensaio foi capaz de detectar diferenças na afinidade que correspondiam aproximadamente a 2 dobras ou mais.

Ensaio de determinação de afinidade

As diluições em série (0,1-10x K_D estimada) de amostras Fab purificadas foram injetadas durante 1 min em 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ e foram permitidos tempos de dissociação até 2 h. As concentrações das proteínas Fab foram determinadas através de ELISA e/ou eletroforese SDS-PAGE utilizando como padrão um Fab de concentração conhecida (conforme determinado pela análise de aminoácidos). As taxas de associação cinética (k_{on}) e as taxas de dissociação (k_{off}) foram obtidas em simultâneo adaptando os dados a um modelo de ligação Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) utilizando o programa BIAevaluation. Os valores da constante de dissociação de equilíbrio (K_D) foram calculados como k_{off}/k_{on} .

B. Humanização e maturação de afinidade do anticorpo antagonista anti-NGF de ratinho 911

O anticorpo anti-NGF antagonista de ratinho 911 (consulte Hongo et al, (2000) *Hybridoma* 19(3):215-227) foi selecionado para humanização e maturação de afinidade. O Mab 911 liga NGF humano e de rato com alta afinidade e não mostra nenhuma reatividade cruzada significativa com as

neurotrofinas NT3, NT4/5 ou BDNF. Consulte Hongo, *id.* A afinidade do fragmento Fab clivado com papaína de ratinho Mab 911 foi determinada utilizando análise BIAcore conforme descrito acima. O fragmento Fab clivado com papaína de ratinho Mab 911 ligou NGF humano com uma K_D de aproximadamente 10 nM.

A humanização e a maturação de afinidade foram realizadas em várias etapas, conforme apresentado em seguida:

(1) Preparação de modelo enxertado com CDR. As CDRs alargadas de cadeia leve de anticorpo 911 (ou seja, incluindo as regiões CDR de Kabat e de Chothia) foram enxertadas em sequências de aceitadores de linha germinal humana 08 com JK2, e as CDRs alargadas de cadeia pesada de anticorpo 911 foram enxertadas numa sequência de aceitadores de linha germinal humana VH4-59 com JH4. As sequências de aminoácidos das sequências de aceitadores de linha germinal humanas são ilustradas nas Figuras 1A e 1B. A numeração de aminoácidos é sequencial. Mediante a utilização das estruturas de proteínas indicadas acima, as sequências de ADN foram concebidas para genes sintéticos que codificam a constituição humana com as CDRs murinas. Estes domínios variáveis pesados e leves humanizados foram denominados hVH e hVL respetivamente. Os codões foram otimizados para utilização de hamster e *E. coli*. Diversos oligonucleótidos sobrepostos (69 a 90 bases de comprimento) que alargam todo o comprimento do hVL e hVH com *primers* de pequeno flaqueamento para cada cadeia foram utilizados para sintetizar separadamente os dois genes através de PCR recursivo, essencialmente conforme descrito em Prodromou et al, (1992) *Protein Eng* 5(8): 827-9. Os fragmentos de ADN resultantes do comprimento correto foram purificados com gel e, em seguida, clonados num plasmídeo de expressão bicistrónica *E. coli* (resistente à ampicilina). A expressão dos anticorpos estava sob controlo de um promotor lacZ

induzido IPTG semelhante ao descrito em Barbas (2001) *Phage display: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press (consulte Vector pComb3X, na pág. 2.10), contudo, as modificações incluíram a adição e expressão dos seguintes domínios adicionais: o domínio constante de cadeia leve Kappa humana (consulte GenBank N.º de Acesso CAA09181) e o domínio constante CHI de imunoglobulina humana IgG2a (GenBank N.º de Acesso P01859).

As sequências de aminoácidos das regiões variáveis do anticorpo enxertado com CDR (igualmente denominado "modelo"), denominado 8L2-4D5, são ilustradas igualmente nas Figuras 1A e 1B. A afinidade de 8L2-4D5 foi determinada utilizando a análise BIAcore conforme descrito acima. O 8L2-4D5 ligou o NGF humano com uma K_D de aproximadamente 38 nM.

(2) Introdução de uma mutação de ponto na sequência de constituições. A substituição V71K foi introduzida na cadeia pesada enxertada com CDR utilizando mutagénesis direcionada para o local de PCR recombinante conforme descrito em Innis et al, (1995) *PCR strategies*, San Diego, Academic Press. Esta substituição substituiu o resíduo de constituição humana pelo resíduo de constituição de ratinho correspondente. O anticorpo resultante foi denominado 8L2-6D5, e a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 8L2-6D5 é ilustrada na Figura 1A. A afinidade de 8L2-6D5 foi determinada utilizando a análise BIAcore conforme descrito acima. O fragmento Fab de 8L2-6D5 ligou o NGF humano com uma K_D de aproximadamente 15 nM. O 8L2-6D5 foi escolhido como modelo para maturação de afinidade.

(3) Humanização e maturação de afinidade de CDRs L1, L2, H1 e H2. As CDRs L1, L2, H1 e H2 foram submetidas a humanização e maturação de afinidade. Foram identificadas posições de aminoácidos nas CDRs L1, L2, H1 e H2 que não são essenciais para a estrutura das CDRs com base na

estrutura canônica de Chothia (consulte Al-Lazikani et al (1997) *J. Mol. Biol.* 273(4):927-48); e submetidas a seleção aleatória conforme apresentado em seguida. Foram preparadas duas bibliotecas com as mutações de cadeia leve ou mutações de cadeia pesada ilustradas na Tabela 2, e a CDR L3 ou CDR H3 (ratinho) enxertada, respectivamente, utilizando a mutagênese de cassete PCR com oligonucleótidos degenerados conforme descrito em Kay et al. (1996), *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*, San Diego, Academic Press, utilizando codões de dopagem conforme descrito em Balint et al, (1993) *Gene* 137(1):109-18). De um modo geral, os resíduos de aminoácidos foram alterados para resíduos que são mais comuns em anticorpos humanos, com base nos alinhamentos das sequências de aminoácidos de cadeia leve e cadeia pesada de anticorpo 911 com as sequências de anticorpos de linha germinal humana. O resíduo de aminoácido de tipo selvagem (não substituído) também foi representado na biblioteca com a exceção do resíduo 50 de CDR H2, uma metionina, em que a metionina de tipo selvagem não foi representada na Biblioteca. Os resíduos de metionina são submetidos a oxidação; deste modo, era esperado que a substituição desse resíduo melhorasse a estabilidade do anticorpo resultante. As bibliotecas de Fabs foram clonadas no vetor pComb3X mais as regiões CH1 e Ck humanas, conforme descrito acima.

Tabela 2:

1. Biblioteca de cadeia pesada H1/H2:

CDR-H1

I34 foi alterado para F, L, V, S, P, T, A

ou I

N35 foi alterado para N, T, S ou Y

CDR-H2

M50 foi alterado para todos os 20

aminoácidos naturais

A62 foi alterado para A ou S

L63 foi alterado para L ou V

2. Biblioteca de cadeia leve L1/L2

CDR-L1

S26 foi alterado para S, A, V ou F

D28 foi alterado para D, A, S ou Y

H32 foi alterado para H, N, K, D,
E, Q ou Y

CDR-L2

Y50 foi alterado para Y, D, A ou S

I51 foi alterado para I, T, A ou V

F54 foi alterado para F ou L

S56 foi alterado para S e T

Para experiências de rastreamento de afinidade, cada biblioteca foi ainda emparelhada com a cadeia leve ou pesada enxertada com CDR correspondente (por exemplo, a biblioteca H1/H2 foi emparelhada com a cadeia leve enxertada com CDR), o anticorpo foi expressado, e a afinidade ao NGF humano dos clones individuais foi rastreada utilizando o sistema de ressonância de plasma de superfície (SPR) BIACORE (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ) de acordo com as instruções do fabricante e conforme descrito acima. k_{off} , k_{on} e K_D foram determinadas. Os clones de anticorpo foram ordenados com base nas taxas k_{off} , uma vez que geralmente a maior variação na afinidade é observada nas taxas k_{off} , e ainda porque as taxas k_{off} são independentes da concentração de anticorpo.

A sequência de clones que efetua a ligação foi determinada e a sequência de clones que efetua a ligação é ilustrada na Tabela 3.

Tabela 3: Sequências de aminoácidos L1 e L2, sequências de aminoácidos H1 e H2, e dados cinéticos para clones que efetuam a ligação seguindo o rastreamento de afinidade de clones da biblioteca H1/H2 ou L1/L2.

Dados cinéticos de mutantes de CDR 1-2				
Clones da biblioteca de cadeia leve emparelhados com a cadeia pesada 8L2	Sequência CDRL1 AA	Sequência CDRL2 AA	k_{off} (s ⁻¹)	* K_D (nM)
8L2-6D5 (controle)	RASQDISNHLN (SEQ. ID N.º 12)	YISRFHS (SEQ. ID N.º 13)	**1e-3	25
L129	RASQISISNNLN (SEQ. ID N.º 18)	YTSTRFHS (SEQ. ID N.º 19)	4,5e-4	11
L208	RASQYISNHLN (SEQ. ID N.º 20)	YTSTRFHS (SEQ. ID N.º 21)	4,6e-4	11
L97	RASQISISNQLN (SEQ. ID N.º 22)	YVSRFHS (SEQ. ID N.º 23)	5,6e-4	14
L81	RAFQAISNQLN (SEQ. ID N.º 24)	YISRFHT (SEQ. ID N.º 25)	7,4e-4	18
L6	RAFQISISNQLN (SEQ. ID N.º 26)	YASRFHS (SEQ. ID N.º 27)	8,2e-4	20
Clones da biblioteca de cadeia pesada emparelhados com a cadeia leve 6D5	Sequência CDRH1 AA	Sequência CDRH2 AA	k_{off} (s ⁻¹)	* K_D (nM)
8L2-6D5 (controle)	GFSLIGYDIN (SEQ. ID N.º 9)	MIWGDGTTDYNSA L (SEQ. ID N.º 10)	1e-3	25
H109	GFSLIGYDSN (SEQ. ID N.º 28)	IIWGDGTTDYNSAL (SEQ. ID N.º 29)	1,6e-4	4
H19	GFSLIGYDLN (SEQ. ID N.º 30)	IIWGDGTTDYNSAV (SEQ. ID N.º 31)	2,4e-4	6
H222	GFSLIGYDVT (SEQ. ID N.º 32)	GIWGDGTTDYNSA V (SEQ. ID N.º 33)	3,8e-4	9,5

Dados cinéticos de mutantes de CDR 1-2				
H225	GFSLIGYDVT (SEQ. ID N.º 34)	GIWGDGTTDYNSS V (SEQ. ID N.º 35)	3,8e-4	9,5
H18	GFSLIGYDAT (SEQ. ID N.º 36)	GIWGDGTTDYNSSA V (SEQ. ID N.º 37)	4,2e-4	10,5
H9	GFSLIGYDVS (SEQ. ID N.º 38)	IIWGDGTTDYNSSV (SEQ. ID N.º 39)	4,1e-4	10,2
H227	GFSLIGYDIS (SEQ. ID N.º 40)	QIWGDGTTDYNSS V (SEQ. ID N.º 41)	5,4e-4	13,5
H17	GFSLIGYDAS (SEQ. ID N.º 42)	GIWGDGTTDYNSS V (SEQ. ID N.º 43)	6,1e-4	15,2
H28	GFSLIGYDST (SEQ. ID N.º 44)	SIWGDGTTDYNSSAL (SEQ. ID N.º 45)	7,5e-4	18,7
<p>AA a negrito foram selecionados aleatoriamente conforme indicado acima</p> <p>*K_D calculada utilizando k_{on} 4e4 M⁻¹s⁻¹</p> <p>**Por uma questão de conveniência, "e" conforme aqui utilizado refere-se a "x10".</p> <p>Deste modo, 4e4 significa alternadamente 4x10⁴.</p>				

As CDRs que contêm as seguintes substituições mantiveram a ligação:

CDR-H1

134: S, L, V, I e A ligados.

N35: N, T e S ligados.

CDR-H2

M50: M, I, G, Q, S, L ligados.

A62: A e S ligados.

L63: L e V ligados.

CDR-L1

S26: S e F ligados.

D28: D, S, A, Y ligados.

H32: H, N, Q ligados.

CDR-L2

Y50: Y ligado.

I51: I, T, V, A ligados.

F54: F ligado.

S56: S e T ligados.

As CDRs que contêm as seguintes substituições foram selecionadas geralmente com base na afinidade de ligação e combinadas num único clone, denominado H19-L129:

CDR-H1: I34L; N35N (nenhuma alteração)

CDR-H2: M50I; A62A (nenhuma alteração); L63V

CDR-L1: S26S (nenhuma alteração); D28S; H32N

CDR-L2: Y50Y (nenhuma alteração); I51T; F54F (nenhuma alteração); S56S (nenhuma alteração)

Estas mutações foram combinadas (amplificando as cadeias H e L através de PCR, cortando os produtos PCR e vetor (pRN8) com enzima de restrição e efetuando uma ligação de fragmento 3) num único clone, denominado H19-L129, que também incluía as CDRs H3 e L3 enxertadas. A sequência das regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve de H19-L129 é ilustrada nas Figuras 1A e 1B, e a Tabela 4 ilustra a sequência de aminoácidos das CDRs L1, L2, H1 e H2. O H19-L129 ligou o NGF com uma K_D de aproximadamente 1 nM, conforme determinado utilizando a análise BIAcore aqui descrita.

Tabela 4: Sequência de aminoácidos das CDRs H1, H2, L1 e L2 e dados cinéticos para o clone combinado H19-L129.

Clone de combinação: mutações nas CDRs H1, H2, L1, L2	Sequência CDRL1 CDRH1 AA	Sequência CDRL2 CDRH2 AA	K_{off} (s ⁻¹)	* K_D (nM)
H19-L129	CDR-L1: RASQSISSNNLN (SEQ. ID N.º 18) CDR H1: GFSLIGYDLN (SEQ. ID N.º 30)	CDRL2: YTSRFHS (SEQ. ID N.º 19) CDR-H2: IIWGDGTTDYN SAV (SEQ. ID N.º 31)	1,1e-4	3,5
* K_D calculada utilizando k_{on} 4e4 M ⁻¹ s ⁻¹				

(4) Maturação de afinidade das CDRs H3 e L3. A maturação de afinidade das CDRs H3 e L3 foi realizada em duas etapas. Primeiro, num processo denominado “mutagênese de varrimento por bibliotecas”, em que cada resíduo de aminoácido na H3 e L3 foi pré-rastreado individualmente para identificar as posições de aminoácidos nas quais uma mutação resultou numa maior afinidade de ligação ao NGF humano. Com base nos resultados da mutagênese de varrimento por bibliotecas (igualmente denominada “análise de seleção aleatória de biblioteca pequena”), foi selecionado um subconjunto de posições de aminoácidos na H3 e L3 para preparação da biblioteca de maturação de afinidade, e a biblioteca de maturação de afinidade foi rastreada relativamente à afinidade ao NGF humano utilizando a análise BIAcore conforme aqui descrito. É óbvio que estas técnicas podem ser aplicadas geralmente.

(a) Mutagênese de varrimento por bibliotecas

Cada posição de aminoácido nas CDRs H3 e L3 CDRs foi pré-rastreada individualmente relativamente às substituições que resultaram numa maior afinidade de ligação ao NGF humano. A frequência de substituições de aminoácidos numa determinada posição que resultou numa ligação melhorada, na mesma ligação, numa ligação pior ou em nenhuma ligação forneceu informações relacionadas com posições nas CDRs que podem ser alteradas para muitos aminoácidos diferentes (incluindo todos os 20 aminoácidos), e posições nas CDRs que não podem ser alteradas ou que apenas podem ser alteradas para poucos aminoácidos. As substituições de aminoácidos que resultam numa maior afinidade de ligação também foram identificadas. Com base nos resultados deste rastreio, foi selecionado um subconjunto de posições de aminoácidos nas CDRs H3 e L3 para a preparação de uma biblioteca de maturação de afinidade.

Foram preparadas bibliotecas de Fab individual, nas

quais cada aminoácido das CDRs L3 e H3 foi selecionado aleatoriamente para todos os 20 aminoácidos, um de cada vez, resultando em diversas (5 bibliotecas para a cadeia leve e 13 bibliotecas para a cadeia pesada) bibliotecas pequenas, cada uma com uma complexidade de 20 possibilidades de aminoácido em cada posição de aminoácido. Em todos os casos, o aminoácido nativo (ou seja, inalterado) foi representado na biblioteca. As bibliotecas foram preparadas por mutagênese de cassete PCR com oligonucleótidos degenerados conforme descrito em Kay et al. (1996), *Phage display of Peptides and Proteins: a laboratory manual*, San Diego, Academic Press, utilizando o codão de dopagem NNK para selecionar aleatoriamente uma posição de aminoácido para incluir 20 possíveis aminoácidos. O 8L2-6D5 (o anticorpo enxertado com CDR que tem a mutação de estrutura V71K) serviu de modelo para a construção da biblioteca, porque a afinidade mais baixa do anticorpo enxertado com CDR permitiu uma detecção mais fácil das diferenças na afinidade nos mutantes H3 e L3 durante o rastreamento. Deste modo, cada membro de uma biblioteca continha uma CDR3 (H3 ou L3) com uma substituição de aminoácido e 5 CDRs enxertadas.

Foram rastreados 20 a 80 de cada biblioteca pequena utilizando a análise BIAcore conforme aqui descrito. As amostras foram analisadas simultaneamente por BIAcore relativamente à afinidade de ligação ao NGF num canal do chip BIAcore e à presença de Fab mediante ligação a um anticorpo de etiqueta penta-his noutra canal do chip-sensor, para detetar a etiqueta his no C-terminal da cadeia pesada. Os clones que expressaram a proteína foram classificados como tendo a mesma afinidade, pior afinidade, melhor afinidade ou nenhuma ligação, utilizando k_{off} para classificar. Os resultados desta análise são ilustrados na Tabela 5.

Tabela 5. Os clones que expressaram a proteína foram classificados como tendo a mesma afinidade, pior afinidade, melhor afinidade ou nenhuma ligação, com base em k_{off} .

mutação	melhor $1e-3 <$	mesma $\geq 1e-3, 2e-3 <$	pior $\geq 2e-3$	nenhuma ligação	Percentagem de AAs que mantêm a capacidade de ligação
Cadeia leve					
L_S91X	13%	40%	20%	26%	50%
L_K92X		100%			~100%
L_T93X		93%	7%		93%
L_L94X		40%	60%		40%
L_Y96X		13%	80%	7%	13%
Cadeia pesada					
H_G98X		50%	37%	13%	50%
H_G99X		46%	54%		46%
HY100X		26%		73%	26%
H_Y101X	6%		12%	82%	6%
H_Y102X		7%	25	68%	7%
H_G103X	4%	21%	16%	58%	25%
H_T104X		20%	30%	50%	20%
H_S105X	10%	25%	26%	39%	35%
H_Y106X		75%	25%		75%
H_Y107XX		8%	46%	46%	8%
H_F108X		23%	27%	50%	23%
H_D109X		29%	46%	25%	29%
H_Y110X		90%	5%	5%	90%

A sequência de todos os clones com afinidade melhorada foi determinada, revelando a frequência e identidade das substituições de aminoácidos que resultaram numa maior afinidade. Além disso, foram selecionados alguns clones que mantiveram uma afinidade semelhante ao clone 812-6D5 a

partir de cada biblioteca para verificar as substituições da sequência de aminoácidos que foram permitidas numa determinada posição, mesmo que a substituição não tenha necessariamente aumentado a afinidade de ligação. Os resultados desta análise estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6:

<u>Mutações de CDR H3</u>	$k_{off} (s^{-1})$ 1E-3	$K_D' (nM)$ 25
(modelo de 8L2-6D5, incluindo a sequência de aminoácidos da CDR-H3 de anticorpo 911: GGYYYGTSYYFDY (SEQ. ID N.º 11))		
Y100L	1,2E-3	30
Y100R	1,1E-3	27
Y101W	5,6E-4	14
G103A	1,6E-4	4
T104S	2,2E-3	55
S105A	5,1E-4	13
S105T	6,4E-4	16
Y106R	1,6E-3	40
Y106T	2,0E-3	50
Y106M	2,7E-3	67
Y107F	1,4E-3	35
F108W	1,22E-3	30
D109N	1,5E-3	37
D109G	1E-3	25
Y110K	1,4E-3	35
Y110S	1,5E-3	37
Y110R	1,6E-3	40
Y110T	1,7E-3	42
<u>Mutações de CDR L3</u> (modelo de 8L2-6D5, incluindo a sequência de aminoácidos da CDR-L3 de tipo selvagem (não substituída): QOSKTLPYT (SEQ. ID N.º 14))	$k_{off} (s^{-1})$ 1E-3	$K_D' (nM)$ 25
S91E	2,5E-4	6
Y96R	1,7E-3	42
* K_D calculada utilizando k_{on} 4e4 M ⁻¹ s ⁻¹		

Diversas mutações resultaram numa maior afinidade de ligação. Pelo menos, as seguintes mutações resultaram numa afinidade de ligação significativamente maior em comparação com o modelo de 8L2-6D5: (H_Y101W (sequência CDR GGYWYGTSYYFDY (SEQ. ID N.º 46)); H_S105A (sequência CDR GGYYYGTAYYFDY (SEQ. ID N.º 47)); H_S105T (sequência CDR GGYYYGTYYFDY (SEQ. ID N.º 48)); H_G103A (sequência CDR GGYYYATSYYFDY (SEQ. ID N.º 49); e L_S91E (sequência CDR QQEKTLPYT (SEQ. ID N.º 50)).

Os resultados desta experiência foram utilizados para orientar a seleção de posições de aminoácidos para a geração das bibliotecas de maturação de afinidade.

Esta experiência forneceu igualmente informações relacionadas com a frequência de substituições de aminoácidos numa determinada posição que resultou numa ligação melhorada, na mesma ligação, numa pior ligação ou em nenhuma ligação, conforme ilustrado na Tabela 5. Estas informações permitiram a identificação de posições de aminoácidos nas CDRs que podem ser alteradas para muitos aminoácidos diferentes (incluindo todos os 20 aminoácidos), e posições nas CDRs que podem ser alteradas para poucos aminoácidos ou muito poucos aminoácidos (em algumas formas de realização, nenhuns aminoácidos). Estes resultados também demonstraram substituições de aminoácidos que aumentaram a afinidade de ligação.

(b) Maturação de afinidade

Em seguida, os resultados da análise de seleção aleatória de biblioteca pequena (acima) foram utilizados para selecionar resíduos para a produção das bibliotecas H3 e L3 para maturação de afinidade das CDRs H3 e L3. Os resíduos Y101 e G103 da CDR H3 e os resíduos S91 e K92 da CDR L3 foram selecionados para a produção das bibliotecas H3 e L3 para maturação de afinidade das CDRs H3 e L3.

Esta biblioteca combinou mutações na H3 e L3 ao mesmo tempo no clone 8L2-6D5 enxertado com CDR, e separadamente

no fundo do H19-L129, e teve uma diversidade de 80 clones diferentes. A Tabela 7 ilustra os resíduos de aminoácidos selecionados para substituição e os aminoácidos que foram substituídos em cada posição.

Tabela 7. Resíduos de aminoácidos na H3 e L3 selecionados para substituição e os aminoácidos que foram substituídos em cada posição

CDR-H3:

Y101 foi alterado para Y e W, C. (Note que C foi incluído porque a utilização do codão TRS num oligonucleótido degenerado também gerou o codão C).

G103 foi alterado para A, P, S

CDR-L3:

S91 foi alterado para E.

K92 foi alterado para todos os vinte aminoácidos. A, R, K e H ligados.

Cada polipéptido foi expressado como um Fab, e a afinidade ao NGF humano de 96 clones individuais foi rastreada relativamente a cada biblioteca que utiliza a análise BIACORE de acordo com as instruções do fabricante e descritas acima. Os resultados desta análise são ilustrados na Tabela 8.

Tabela 8:

<u>Mutações de COMBINAÇÃO CDR L3 H3</u>	$K_{off} (s^{-1})$ 1E-3	$K_D^* (nM)$ 25
(modelo de 8L2-6D5)		
L_S91E; L_K92A (sequência CDR QQEATLPYT (SEQ. ID N.º 51)) H_Y101W; H_G103A (sequência CDR GGYWYATSYFDY (SEQ. ID N.º 52))	5,5E-4	13
L_S91E; L_K92R (sequência CDR QQERTLPYT (SEQ. ID N.º 53)) H_Y101W; H_G103A (sequência CDR GGYWYATSYFDY (SEQ. ID N.º 54))	1,0E-4	25

<u>Mutações de COMBINAÇÃO CDR L3 H3</u>	k_{off} (s ⁻¹)	K_D^* (nM)
(modelo de H19-L129, H1H2L1L2 maturado)	1,1e-4	
L_S91E; L_K92H (sequência CDR QQEHTLPYT (SEQ. ID N.º 55)) H_Y101W; H_G103A (sequência CDR GGYWYATSYFFDY (SEQ. ID N.º 56)) (CLONE E3)	1,2E-5	0,3
L_S91E; L_K92S (sequência CDR QQESTLPYT (SEQ. ID N.º 57)) H_Y101W; H_G103S (sequência CDR GGYWYSTSYFFDY (SEQ. ID N.º 58))	4,7E-5	1,1
L_S91E; L_K92K (sequência CDR QQEKTLPYT (SEQ. ID N.º 59)) H_Y101Y; H_G103A (sequência CDR GGYYYATSYFFDY (SEQ. ID N.º 60))	2E-5	0,5
L_S91E; L_K92R (sequência CDR QQERTLPYT (SEQ. ID N.º 61)) H_Y101W; H_G103A (sequência CDR GGYWYATSYFFDY (SEQ. ID N.º 62)) (CLONE 3C)	1,4E-5	0,35
L_S91E; L_K92R (sequência CDR QQERTLPYT (SEQ. ID N.º 63)) H_Y101Y; H_G103A (sequência CDR GGYYYATSYFFDY (SEQ. ID N.º 64))	1,5E-5	0,37
* K_D calculada utilizando k_{on} 4e4 M ⁻¹ s ⁻¹		

Com base na afinidade de ligação, os melhores clones, E3 (alternadamente denominado "3E") e 3C, foram selecionados para mais caracterização. O E3 compreendia as seguintes substituições de CDR: CDR-H3: Y101W, G103A; e CDR-L3: S91E, K92H, que foram combinadas num único clone que incluía igualmente as seguintes mutações L1, L2, H1 e H2:

CDR-H1: I34L;

CDR-H2: M50I; L63V;

CDR-L1: D28S; H32N;

CDR-L2: I51T.

A sequência das regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve de E3 é ilustrada nas Figuras 1A e 1B. O 3C compreendia as seguintes substituições de CDR: CDR-L3: S91E; K92R; CDRH3: Y101W; G103A, que foram combinadas num único clone que incluía igualmente as mutações L1, L2, H1 e H2 descritas para o clone 3E.

As sequências de 3E e 3C foram clonadas em vetores de expressão mamífera para a produção de Fab e anticorpo inteiro, expressadas nas células HEK293 e purificadas utilizando cromatografia de proteína A ou Ni-NTA. A proteína pura foi quantificada de modo exato pela análise de aminoácidos.

As afinidades de ligação ao NGF humano de Fabs E3 e 3C foram medidas utilizando a análise BIAcore de acordo com as instruções do fabricante e conforme descrito acima, com a exceção de terem sido utilizados 100 RU de NGF no chip para prevenir um efeito de religação. Em resumo, diversas concentrações de anticorpos (Fabs) foram injetadas durante 2 minutos num chip CM5 com 100 RU de NGH humano imobilizado, e puderam ser dissociadas durante 1800 segundos. O anticorpo de ratinho 911 (Fab) foi analisado como um controlo. Os dados foram analisados utilizando o software BIAevaluation seguindo as instruções do fabricante. Os resultados da análise do anticorpo E3 e 911 são ilustrados nas Figuras 9 e 10. O E3 ligou o NGF humano com uma K_D de aproximadamente 0,07 nM (e com uma k_{on} de cerca de $6,0e5 M^{-1}s^{-1}$, e uma k_{off} de cerca de $4,2e-5 s^{-1}$). O 3C ligou o NGF humano com uma K_D de aproximadamente 0,35 nM (com uma k_{off} de cerca de $1,4E-5$). Em contraste, o anticorpo de ratinho 911 ligou o NGF com uma K_D de 3,7 nM, k_{off} de $8,4 \times 10^{-5} s^{-1}$ e k_{on} de $2,2 \times 10^4 Ms^{-1}$.

O anticorpo E3 (alternadamente denominado 3E) foi selecionado para mais análise com base na alta afinidade de ligação. Para testar a capacidade de E3 para prevenir a

interação do NGF com os recetores NGF trkA e p75, 2,5 nM de NGF humano foram pré-misturados e incubados durante uma hora com 0 a 50 nM de anticorpo E3 (Fab). Após a incubação, as amostras foram injetadas em 10 ul/minuto num chip CM5 BIAcore com 260 RU de p75 (canal 2) e 600 RU de trkA (canal 3), e a percentagem de ligação foi determinada. Os resultados desta análise são ilustrados na Figura 11. As concentrações maiores de Fab E3 bloquearam a interação do NGF com p75 e trkA, conforme ilustrado pelo sinal diminuído (medido em RU), que indica que o Fab E3 bloqueia a interação do NGF humano com trkA e p75. Quando a concentração de anticorpo E3 (Fab) igualou a concentração de NGF (numa concentração de NGF de cerca de 2,5 nM), não foi observada nenhuma ligação de NGF (conforme ilustrado por um sinal de zero). O facto de a ligação de recetor NGF de percentagem zero ter ocorrido quando a concentração de NGF era igual à concentração de anticorpo 3E sugeriu que 2,5 nM de NGF tinham, pelo menos, dez dobras a mais do que a K_D de E3 para o NGF e estavam em equilíbrio.

Exemplo 2: avaliação da capacidade de bloqueio de NGF de anticorpos anti-NGF utilizando ratinho

Ensaio de sobrevivência de neurónios trigeminais E13.5

A capacidade de Fab E3 ou anticorpo inteiro E3 de bloquear a atividade de NGF foi avaliada através da medição da capacidade do anticorpo de inibir a sobrevivência dependente do NGF de neurónios trigeminais E13.5 de rato *in vitro*. O gânglio trigeminal é composto por neurónios sensoriais cutâneos que enervam a região facial. A sobrevivência de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho é um ensaio preciso para avaliar a atividade de bloqueio de NGF dos anticorpos antagonistas anti-NGF, uma vez que o NGF é requerido para suportar a sobrevivência destes neurónios. Por exemplo, nas concentrações de saturação de NGF, a sobrevivência é próxima de 100% durante 48 horas na cultura. Em contraste, menos de 5% dos neurónios sobrevivem

durante 48 horas na ausência de NGF.

O ensaio de sobrevivência foi realizado conforme apresentado em seguida: as fêmeas de ratinhos Swiss Webster prenhas acasaladas ao longo do tempo foram eutanasiadas por inalação de CO₂. Os cornos uterinos foram removidos e os embriões na fase embrionária E13.5 foram extraídos e decapitados. Os gânglios trigeminais foram dissecados utilizando agulhas de tungstênio eletroliticamente afiadas. Em seguida, os gânglios foram tripsinizados, mecanicamente dissociados e colocados em placas numa densidade de 200 a 300 células por poço no meio sem soro definido em placas de 96 poços revestidas com poli-L-ornitina e laminina.

A atividade de bloqueio de anticorpos ou Fabs anti-NGF foi estimada adicionando aos neurónios trigeminais doses variáveis de anticorpos anti-NGF Mab 911 (Fab), 8L2-6D5; H19-L129; E3 e 3C; e NGF humano ou de rato nas seguintes concentrações: 0,4 ng/ml (~15 pM; esta concentração representava uma concentração de saturação de NGF para sobrevivência) e 0,04 ng/ml (~1,5 pM; esta concentração está em torno do IC₅₀). Após 48 horas na cultura, as células foram submetidas a um protocolo de imunocitoquímica automatizada efetuado numa estação de trabalho de manuseamento de líquido Biomek FX (Beckman Coulter) conforme apresentado em seguida: fixação utilizando 4% de formaldeído, 5% de sacarose e PBS; permeabilização utilizando 0,3% de Trítio X-100 no PBS); bloqueio de locais de ligação não específicos utilizando 5% de soro de cabra normal, 0,11% de BSA no PBS; e incubação sequencial com anticorpos primários e secundários para detetar neurónios. O anticorpo primário era um anticorpo policlonal de coelho contra o produto de gene de proteína 89.5 (PGP9.5, Chemicon), um marcador fenotípico neuronal estabelecido. O anticorpo secundário era cabra anti-coelho Alexa Fluor488 (Sondas Moleculares), juntamente com a coloração nuclear Hoechst 33342 (Sondas Moleculares) para rotular os núcleos

de todas as células presentes na cultura. A aquisição de imagens e a análise de imagens foram efetuadas num Gerador de Imagens Discovery-I/GenII (Universal Imaging Corporation). As imagens foram adquiridas automaticamente em dois comprimentos de onda para Alexa Fluor 488 e Hoechst 33342, com a coloração nuclear sendo utilizada como ponto de referência para o sistema de foco automático baseado em imagens do Gerador de Imagens, uma vez que a coloração nuclear está presente em todos os poços. Os objetivos e o número de locais com imagens apropriados por poço foram selecionados para cobrir toda a superfície de cada poço. A análise de imagens automatizada foi configurada para contar o número de neurónios presentes em cada poço após 48 horas na cultura com base na respetiva coloração específica com o anticorpo anti-PGP9.5. O limiar cuidadoso da imagem e aplicação do filtro de seletividade baseado na morfologia e intensidade de fluorescência resultou numa contagem exata de neurónios por poço.

Os resultados desta experiência demonstraram que Fab E3 bloqueou a atividade de NGF com uma alta afinidade. Os resultados são ilustrados nas Figuras 4 a 6 e na Tabela 9.

A Figura 4 é um gráfico que ilustra a sobrevivência dependente de NGF de neurónios E13.5 na presença de uma concentração variável de NGF humano e de rato.

A Figura 5 é um gráfico que compara o efeito de bloqueio de NGF de vários Fabs na presença de 0,04 ng/ml de NGF humano (aproximadamente 1,5 pM; ilustrado no painel inferior) ou 0,4 ng/ml de NGF humano (aproximadamente 15 pM; ilustrado no painel superior). 1,5 pM de NGF estavam em torno do EC50 do NGF que provoca a sobrevivência, enquanto 15 pM representavam uma concentração de saturação de NGF. A sobrevivência de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho em várias concentrações de Fab E3; Fab 911 murino; e Fab H19-L129 e Fab 8L2-6D5 foi estimada conforme descrito acima. O IC50 (em pM) foi calculado para cada Fab em cada

concentração de NGF, tal como é ilustrado na Tabela 9. O Fab E3 bloqueou fortemente a sobrevivência de neurónios trigeminais dependente de NGF humano com um IC50 de aproximadamente 21 pM na presença de 15 pM de NGF humano, e um IC50 de aproximadamente 1,2 pM na presença de 1,5 pM de NGF humano. Os Fabs 3C e H19-L129 também bloquearam fortemente a sobrevivência de neurónios trigeminais dependente de NGF humano.

A Figura 6 é um gráfico que compara o efeito de bloqueio de NGF de vários Fabs na presença de 0,04 ng/ml de NGF de rato (aproximadamente 1,5 pM; ilustrado no painel inferior) ou 0,4 ng/ml de NGF de rato (aproximadamente 15 pM; ilustrado no painel superior). 1,5 pM de NGF estavam em torno do EC50, enquanto 15 pM representavam uma concentração de saturação de NGF. A sobrevivência de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho em várias concentrações de Fab E3; Fab 911 murino; e Fab H19-L129 e 8L2-6D5 foi estimada conforme descrito acima. O EC50 (em pM) foi calculado para cada Fab em cada concentração de NGF, tal como é ilustrado na Tabela 9. O Fab E3 bloqueou fortemente a sobrevivência de neurónios trigeminais dependente de NGF humano com um IC50 de aproximadamente 31,6 pM na presença de 15 pM de NGF de rato, e um IC50 de aproximadamente 1,3 pM na presença de 1,5 pM de NGF de rato. Os Fabs 3C e H19-L129 também bloquearam fortemente a sobrevivência de neurónios trigeminais dependente de NGF de rato.

Tabela 9:

NGF humano	IC50 (na presença de 15 pM de NGF)	IC50 (na presença de 1,5 pM de NGF)
	pM	pM
Fab 8L2-6D5	1580,5	461,8
Fab H19-L129	60,1	9,6
Fab 3E	<21,0	<1,2
Fab 3C	80,9	5,6
Fab 911	322,3	63,5

NGF de rato	IC50 (15 pM de NGF)	IC50 (1,5 pM de NGF)
	pM	pM
Fab 8L2-6D5	730,3	169,4
Fab H19-L129	31,0	6,0
Fab 3E	<8,3	<1,3
Fab 3C	31,6	6,0
Fab 911	161,0	34,6

Numa experiência diferente, foi comparada a capacidade do anticorpo inteiro E3 e Fab 3E para inibir a sobrevivência dependente de NGF de neurónios E13.5 na presença de 0,4 ng/ml (concentração de saturação) de NGF humano. Os resultados da análise são ilustrados na Figura 12. O anticorpo inteiro E3 e Fab 3E mostraram níveis semelhantes de inibição de sobrevivência dependente de NGF quando a concentração de todo o anticorpo e Fab foi normalizada para o número de locais de ligação de NGF (o Fab tem um local de ligação e todo o anticorpo tem dois locais de ligação). Estes resultados demonstraram que não existia nenhum efeito de avidéz devido à ligação de um anticorpo inteiro ao dímero NGF.

Noutras experiências, foi comparada a capacidade de várias concentrações (20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 0,0064, 0,00128 e 0,0 nM) de anticorpo E3, anticorpo 911, e uma imunoadesina de recetor trkA (que consiste no domínio extracelular do recetor trkA NGF fundido com o domínio Fc de immunoglobulina, CH2-CH3) para inibir a sobrevivência dependente de NGF de neurónios E13.5 na presença de 0,4 ng/ml (condições de saturação). Estes resultados são ilustrados na Figura 13. Estes resultados demonstraram que o anticorpo E3 bloqueou o NGF melhor do que o anticorpo 911 ou a imunoadesina trkA.

Exemplo 3: avaliação da especificidade do anticorpo E3 anti-NGF utilizando ensaios de sobrevivência de neurónios nodosos e trigeminais de ratinho

A capacidade do anticorpo E3 para bloquear

especificamente a atividade de NGF foi avaliada através da medição da capacidade do anticorpo para inibir a sobrevivência de neurónios trigeminais E17/18 de ratinho *in vitro* na presença de concentrações de saturação de NGF, da neurotrofina NT3 relacionada com NGF ou do fator neurotrófico não relacionado com NG, e da proteína estimulante de macrófagos (MSP). A sobrevivência de neurónios trigeminais E17/18 de ratinho é um ensaio preciso para avaliar a atividade de bloqueio de NGF dos anticorpos antagonistas anti-NGF, uma vez que o NGF é requerido para suportar a sobrevivência destes neurónios em concentrações mais elevadas do que o nível de NGF requerido para suportar a sobrevivência de neurónios TG E 13.5). A sobrevivência destes neurónios também é suportada por NT3 ou MSP; por conseguinte, a sobrevivência destes neurónios é igualmente um ensaio preciso para avaliar se o anticorpo antagonista anti-NGF também bloqueou NT3 ou MSP.

A capacidade do anticorpo E3 para bloquear especificamente a atividade de NGF também foi avaliada através da medição da capacidade do anticorpo para inibir a sobrevivência de neurónios E17 nodosos de ratinho na presença de concentrações de saturação de BDNF ou NT4/5. A sobrevivência de neurónios nodosos é suportada por BDNF ou NT4/5; por conseguinte, a sobrevivência destes neurónios é um ensaio preciso para avaliar a capacidade de bloqueio de BDNF ou NT4/5 do anticorpo antagonista anti-NGF.

O ensaio de sobrevivência foi realizado conforme apresentado em seguida: as fêmeas de ratinhos Swiss Webster prenhas acasaladas ao longo do tempo foram eutanasiadas por inalação de CO₂. Os cornos uterinos foram removidos e os embriões (no dia embrionário 17 ou 18) foram extraídos e decapitados. Os gânglios trigeminais e nodosos foram dissecados e limpos. Em seguida, os gânglios foram tripsinizados, mecanicamente dissociados e colocados em placas numa densidade de 100 a 300 células por poço no meio

sem soro definido em placas de 4 poços (Greiner) revestidas com poli-L-ornitina e laminina.

Os neurónios trigeminais E17/18 cresceram sem fatores neurotróficos adicionados (controlo negativo) ou na presença de concentrações de saturação de NGF humano (400pM e 15pM) (controlo positivo); NT3 (400 pM); ou MSP (600pM). Foram organizadas culturas duplicadas que incluíam concentrações variáveis de Fabs E3 e 911 e anticorpos inteiros. A concentração de Fab e anticorpos inteiros foi indicada por local de ligação (por ex., um anticorpo inteiro contém dois locais de ligação, enquanto um Fab contém um local de ligação).

Os neurónios nodosos E17 cresceram na ausência de fatores neurotróficos adicionados (controlo negativo), ou com concentrações de saturação de BDNF (400pM) (controlo positivo) ou NT4/5 (400pM) ou fator de crescimento não relacionado com NGF ILF (fator inibitório de interleucina). Foram utilizadas concentrações elevadas de neurotrofinas, uma vez que o objetivo desta experiência era testar a especificidade dos anticorpos. Foram organizadas culturas duplicadas que incluíam concentrações variáveis com e sem a adição de anticorpos E3 e 911. Após 48 horas na cultura, o número total de neurónios sobreviventes em cada poço em cada condição foi verificado através de contagem manual utilizando um microscópio de contraste de fase.

Os resultados destas experiências demonstraram que os anticorpos E3 e 911 bloquearam completamente a sobrevivência que provoca os efeitos de NGF nos neurónios trigeminais E18. Em contraste, os anticorpos E3 e 911 não tiveram nenhum efeito na sobrevivência dos neurónios trigeminais provocada por NT3 ou MSP, ou na sobrevivência de neurónios nodosos provocada por BDNF ou NT4/5 ou LIF. Estes resultados demonstraram que o anticorpo E3 tinha especificidade seletiva para NGF, uma vez que não foi detetada nenhuma interação entre estes anticorpos e outras

neurotrofinas relacionadas com NGF (NT3, NT4/5, BDNF) em concentrações de 1000 dobras a 10.000 dobras a mais do que a concentração eficaz para o bloqueio de NGF. Além disso, estes resultados demonstraram que a morte neuronal observada nas culturas complementadas com NGF de neurónios dependentes de NGF na adição do anticorpo ou Fab E3 se deveu a uma interação específica entre estes anticorpos e o NGF e não a um efeito tóxico generalizado. O anticorpo antagonista anti-NGF de ratinho 911 foi igualmente testado, e foram observados resultados semelhantes. Note que, devido às concentrações elevadas de neurotrofinas utilizadas, o anticorpo E3 e 911 estão muito perto das respetivas condições de titulação e é esperado que liguem o NGF em níveis semelhantes, uma vez que as diferenças na afinidade de ligação destes anticorpos ao NGF são menos evidentes nestas condições.

Os resultados destas experiências são ilustrados nas Figuras 14, 15, 16 e 17. Os dados ilustraram a percentagem média de sobrevivência após 48 horas na cultura (\pm erro padrão da média, $n=3$ para cada ponto de dados) em relação à sobrevivência observada no controlo positivo para cada experiência (por ex., 100% de sobrevivência de neurónios trigeminais desenvolvidos na presença de concentração de NGF de saturação, e 100% de sobrevivência de neurónios nodosos desenvolvidos na presença de concentração de BDNF de saturação, respetivamente). As Figuras 14 e 15 são gráficos que ilustram que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 ou Fab E3 não inibiu a sobrevivência provocada por NT3, e MSP, mesmo nas concentrações de anticorpo tão elevadas como 200 nM. Em contraste, 20 nM de anticorpo E3 ou Fab 3E e Fab 911 bloquearam totalmente a sobrevivência deduzida por NGF. O anticorpo antagonista anti-NGF de ratinho 911 foi igualmente testado, e foram observados resultados semelhantes. Especificamente, a Figura 14 é um gráfico que ilustra a comparação do efeito de várias concentrações (20

nM, 2 nM ou 0,2 nM) de E3 Fab (denominado "3E" na figura) e anticorpo de ratinho 911 Fab na sobrevivência de neurónios trigeminais E18 na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "controlo"), 400 pM de NGF (denominado "NGF-400pM"), 10 nM de NT3 (denominado "NT3-10nM") ou 600 pM de MSP (denominado "MSP-600 pM"). A Figura 15 é um gráfico que representa a comparação do efeito de várias concentrações (200 nM e 80 nM) de E3 Fab, anticorpo inteiro, anticorpo de ratinho 911, anticorpo inteiro e Fab na sobrevivência de neurónios trigeminais E17 na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "sem fator"), 400 pM de NGF (denominado "NGF-400pM"), 10 nM de NT3 (denominado "NT3-10nM") ou 600 pM de MSP (denominado "MSP-600 pM").

As Figuras 16 e 17 são gráficos que ilustram que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 ou Fab E3 não inibiu a sobrevivência de neurónios nodosos E17 provocada por BDNF, NT4/5 ou LIF. O anticorpo antagonista anti-NGF de ratinho 911 foi igualmente testado, e foram observados resultados semelhantes. Especificamente, a Figura 16 é um gráfico que ilustra a comparação do efeito de várias concentrações (200 nM ou 80 nM) de anticorpo inteiro E3 (denominado "3E" na figura), Fab E3, anticorpo inteiro 911 ou Fab 911 na sobrevivência de neurónios nodosos E17 na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "sem fatores"), 400 pM de BDNF (denominado "BDNF-400pM"), 400 pM de NT4/5 (denominado "NT4/5-400pM") ou 2,5 nM de LIF (denominado "LIF-2,5 nM"). A Figura 17 é um gráfico que ilustra a comparação do efeito de várias concentrações (200 nM, 20 nM, 2nM) de Fab E3 (denominado "3E" na figura) ou Fab 911 na sobrevivência de neurónios nodosos E17 na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "controlo"), 400 pM de BDNF (denominado "BDNF-400pM"), 400 pM de NT4/5 (denominado "NT4/5-400pM") ou 2,5 nM de LIF (denominado "LIF-2,5 nM").

Exemplo 5: preparação de vetores de expressão mamífera e expressão de anticorpo E3 nas células de mamífero

Três vetores de expressão mamífera foram concebidos e construídos para utilização na expressão de anticorpo E3 nas células de mamífero.

O vetor Db.911.3E é um vetor de expressão que compreende a região variável de cadeia pesada do anticorpo E3 e a região constante IgG2a humana, e é adequado para a expressão transitória ou estável da cadeia pesada. O Db.911.3E consiste em sequências de nucleótidos que correspondem às seguintes regiões: a região promotora de citomegalovírus murino (nucleótidos 1-612); um intrão sintético (nucleótidos 619-1507); a região de codificação DHFR (nucleótidos 707-1267); péptido de sinal de hormona de crescimento humano (nucleótidos 1525-1602); região variável de cadeia pesada de anticorpo 3E (nucleótidos 1603-1965); região constante de cadeia pesada IgG2a humana que contém as seguintes mutações: A330P331 a S330S331 (numeração de aminoácidos com referência à sequência IgG2a de tipo selvagem; consulte *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624); sinal de poliadenilação tardia SV40 (nucleótidos 2974-3217); região intensificadora SV40 (nucleótidos 3218-3463); região f1 de bacteriófagos (nucleótidos 3551-4006) e região de codificação de beta-lactamase (AmpR) (nucleótidos 4443-5300). O Db.911.3E foi depositado no ATCC a 8 de janeiro de 2003, e foi-lhe atribuído o ATCC N.º de Acesso PTA-4895.

O vetor Eb.911.3E é um vetor de expressão que compreende a região variável de cadeia leve do anticorpo E3 e a região constante de cadeia kappa humana, e é adequado para a expressão transitória da cadeia leve. O Eb.911.3E consiste em sequências de nucleótidos que correspondem às seguintes regiões: a região promotora de citomegalovírus murino (nucleótidos 1-612); intrão EF-1 humano (nucleótidos 619-1142); péptido de sinal de hormona de crescimento humano (nucleótidos 1173-1150); região variável de cadeia

leve de anticorpo E3 (nucleótidos 1251-1571); região constante de cadeia kappa humana (nucleótidos 1572-1892); sinal de poliadenilação tardia SV40 (nucleótidos 1910-2153); região intensificadora SV40 (nucleótidos 2154-2399); região fl de bacteriófagos (nucleótidos 2487-2942) e região de codificação de beta-lactamase (AmpR) (nucleótidos 3379-423.6). O Eb.911.3E foi depositado no ATCC a 8 de janeiro de 2003, e foi-lhe atribuído o ATCC N.º de Acesso PTA-4893.

O vetor Eb.pur.911.3E é um vetor de expressão que compreende a região variável de cadeia leve do anticorpo E3 e a região constante kappa humana, e é adequado para a expressão estável da cadeia leve. O Eb.pur.911.3E consiste em sequências de nucleótidos que correspondem às seguintes regiões: a região promotora de citomegalovírus murino (nucleótidos 1-612); intrão EF-1 humano (nucleótidos 619-1758); região de codificação de genes PAC (puromicinaR) (nucleótidos 739-1235); região 5'UTR hsp70 humana (nucleótidos 1771-1973); péptido de sinal de hormona de crescimento humano (nucleótidos 1985-2062); região variável de cadeia leve de anticorpo E3 (nucleótidos 2063-2383); região constante de cadeia kappa humana (nucleótidos 2384-2704); sinal de poliadenilação tardia SV40 (nucleótidos 2722-2965); região intensificadora SV40 (nucleótidos 2966-3211); região fl de bacteriófagos (nucleótidos 3299-3654) e região de codificação de beta-lactamase (AmpR) (nucleótidos 4191-5048). O Eb.pur.911.E3 foi depositado no ATCC a 8 de janeiro de 2003, e foi-lhe atribuído o ATCC N.º de Acesso PTA-4894.

A expressão de células transitória foi efetuada conforme apresentado em seguida: as células CHO e HEK293T em placas de 150 mm foram cotransfetadas transitoriamente com 25 ug de cada plasmídeo (ou seja, um plasmídeo que contém a cadeia pesada e um plasmídeo que contém a cadeia leve). O ADN foi misturado com 100 ul de lipofetamina 2000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os

complexos de lípidos de ADN foram colocados em contacto com as células no meio DMEM/F12 sem soro ou antibióticos durante 5 horas. A seguir a esta incubação, os meios foram alterados relativamente à expressão para Opti-MEM (Invitrogen) sem quaisquer aditivos durante dois dias. Os sobrenadantes de células que contêm o anticorpo foram colhidos sequencialmente até quatro vezes com uma substituição subsequente de meios. Os sobrenadantes foram purificados através de cromatografia de afinidade utilizando resina de Proteína A MapSelect (Amersham biosciences 17-5199-02). O anticorpo foi ligado à resina de proteína A em 0,3M de glicina, 0,6M NaCl de tampão com pH 8 e, em seguida, eluída com 0,1 M de tampão de citrato com pH 3. As frações que contêm o anticorpo foram neutralizadas imediatamente com 1 M de tampão Tris com pH 8,0 e as frações de anticorpo foram, em seguida, dialisadas e concentradas no PBS.

Exemplo 6: o anticorpo E3 anti-NGF é eficaz no tratamento da dor pós-cirúrgica

Foi utilizado um modelo de dor que imita a dor pós-cirúrgica para estimar a eficácia do tratamento com o anticorpo E3. O anticorpo E3 compreendia a região constante de cadeia pesada IgG2a humana que contém as seguintes mutações: A330P331 a S330S331 (numeração de aminoácidos relativamente à sequência de IgG2a de tipo selvagem); consulte *Eur. J. Immunol.* (1999) 29. 2613-2624); a região constante de cadeia leve kappa humana; e as regiões variáveis de cadeia pesada e leve ilustradas nas Tabelas 1A e 1B.

Animais. Ratos machos Sprague Dawley com um peso entre 220 e 240 foram fornecidos pela Harlan (Wisconsin) e aclimatados às instalações para animais durante uma semana antes da cirurgia.

Cirurgia. A cirurgia baseou-se no procedimento descrito por Brennan, et al. *Pain* 64:493-501 (1996). Os

animais foram anestesiados com uma mistura de 2% de isoflurano ao ar que foi mantida durante a cirurgia através de uma extremidade cônica. A superfície plantar da pata traseira direita foi preparada com uma compressa de iodopovidona, e foi feita uma incisão longitudinal central de 1 cm na pele e fáscia, que começa em 0,5 cm a partir da ponta do calcanhar e se estende em direção aos dedos. Foram efetuadas medições com uma régua com a pata numa posição fletida. O músculo plantar foi levantado utilizando fórceps curvos e incisado longitudinalmente. O músculo foi incisado em toda a sua profundidade, entre o ponto de partida e a inserção. A hemorragia foi controlada durante a cirurgia mediante pressão aplicada através de uma compressa de gaze. A ferida foi fechada com duas suturas de colchão (5-0 Ethilon, monofilamento preto). Estas suturas foram atadas 5 a 6 vezes, com o primeiro nó atado de forma folgada. O local da ferida foi limpo com uma solução de bacitracina. Os animais puderam recuperar e repousar em gaiolas limpas durante duas horas ou mais antes de os testes de comportamento serem iniciados.

Avaliação da dor em repouso. Foi utilizada uma classificação da dor acumulativa para estimar a dor relacionada com a sustentação do peso. Os animais foram colocados numa rede de plástico (grade: 8 mm²) em gaiolas de plástico limpas que foram elevadas numa plataforma (h: 18") permitindo a inspeção da parte inferior das patas. Após um período de aclimação de 20 minutos, a sustentação do peso foi estimada numa escala de 0 a 2. Foi dada uma classificação de 0 se a pata apresentasse uma cor branca ou estivesse a fazer pressão na rede, indicando uma sustentação de peso completa. Foi dada uma classificação de 1 se a pata estivesse apoiada com a pele apenas a tocar na rede, sem embranquecimento ou marcas da pele. Foi dada uma classificação de 2 se a pata nem tocasse na rede. O recolhimento da pata foi considerado um 2 se o rato ainda

estivesse em repouso. Cada animal foi observado durante 1 minuto de cinco em cinco minutos durante 30 minutos. A soma das 6 classificações (0-12) obtidas durante meia hora foi utilizada para estimar a dor na pata incisada. A frequência das classificações de 2 também foi calculada e utilizada para estimar a incidência da dor grave ou da defesa total da pata por parte do animal. Cada animal foi testado 24 horas antes da cirurgia (ponto de partida) e 2 h, 24 h, 48 h e 72 h pós-operatoriamente. Os resultados desta experiência são ilustrados na Figura 1, que representa a classificação da dor em repouso acumulativa observada em animais tratados com 35 mg/kg de anticorpo 911 de ratinho anti-NGF. Estes resultados demonstraram que o tratamento com anticorpo anti-NGF reduziu significativamente a dor em repouso pós-cirúrgica. A sustentação de peso foi um bom correlativo da vontade que o animal tinha de utilizar o membro e, por conseguinte, foi uma medida eficaz de alívio da dor.

O anticorpo E3 foi injetado via intraperitoneal (i.p.) em várias concentrações do anticorpo (0,004, 0,01, 0,02, 0,1, 0,6, e 1 mg por quilograma de peso do animal) 15 horas pré-incisão. O grupo de controlo negativo não recebeu nenhum anticorpo, mas foi injetado i.p. com uma solução salina. 0,01 mg/kg de fetanil foram injetadas i.p. como um controlo positivo 30 minutos antes dos testes nas 24 horas pós-cirurgia. Cada experiência envolveu 8 animais (n=8 por grupo) para cada condição, e o grupo de controlo tinha 56 animais. A cirurgia foi efetuada e foi medida uma classificação da dor acumulativa conforme descrito acima. A dor em repouso foi avaliada vinte e quatro horas após a cirurgia.

Conforme ilustrado na Figura 7, o anticorpo E3 anti-NGF humanizado reduziu significativamente a dor em repouso ($p < 0,05$) após a cirurgia quando administrado numa dosagem de 0,02 mg/kg a 1 mg/kg. Um "*" indica uma diferença

significativamente significativa do controlo ($p < 0,05$). O tratamento com 0,02 mg/kg mitigou o comportamento da dor pelo menos tão eficazmente como o tratamento com 0,01 mg/kg de fentanil. Esta dose de fentanil é 10 vezes a dose humana normal deste opiáceo potente.

Noutra experiência, foi testada a eficácia do anticorpo E3 na redução da dor pós-cirúrgica quando administrado pós-cirúrgicamente. O anticorpo E3 (0,5 mg/kg) foi injetado intravenosamente (i.v.) duas horas após a cirurgia. O grupo de controlo não recebeu nenhum anticorpo, mas foi injetado i.v. com uma solução salina. A cirurgia foi efetuada, e a dor em repouso expressada como uma classificação da dor acumulativa foi estimada 24 horas após a cirurgia. Conforme ilustrado na Figura 8, o tratamento com o anticorpo anti-NGF reduziu significativamente ($p < 0,05$) a dor em repouso nas vinte e quatro horas após a incisão quando o anticorpo foi administrado 2 horas pós-incisão. Estes resultados demonstraram que o anticorpo E3 mitigou eficazmente a dor pós-cirúrgica quando administrado após a cirurgia.

Exemplo 7: estimativa dos efeitos analgésicos do anticorpo 911 antagonista anti-NGF num modelo de rato de artrite reumatoide

Os efeitos analgésicos do anticorpo anti-NGF, 911 (consulte Hongo et al., *Hybridoma* 19(3):215-227 (2000)) na artrite crónica induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos foram investigados utilizando o teste de vocalização, em comparação com a indometacina utilizada como substância de referência.

Cinquenta (50) ratos machos Lewis (LEWIS LEW/Crl Ico) (Charles River, Bélgica) com um peso entre 150 g e 220 g no início da fase experimental foram incluídos neste estudo. Todos os animais foram mantidos durante, pelo menos, 5 dias antes da experiência e foram alojados numa sala com temperatura (19,5 a 24,5 °C), humidade relativa (45 a 65 %)

e ciclo de claridade/escuridão de 12 h controlados com um acesso livre a água da torneira filtrada e alimentos de laboratório peletizados standardizados (U.A.R., França) durante todo o estudo. Os animais foram identificados individualmente na cauda.

No dia 0 (D0), foi induzida artrite nos ratos por injeção intradermal na cauda de 0,05 ml de uma suspensão de microbactéria butírica (Difco, EUA) em óleo mineral (10 mg/ml). No dia 14 (D14), foram incluídos ratos artríticos no estudo de acordo com a respetiva capacidade de vocalização numa flexão suave da pata traseira e respetivo índice de artrite, avaliados utilizando uma classificação da inflamação para cada pata traseira e dianteira (consulte Kuzuna et al., *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 23:1184-1191 (1975); Pearson et al., *Arthritis Rheum.* 2:440-459 (1959)). Os animais foram classificados com base nos seguintes critérios: Classificação 0: aspeto normal; Classificação 1: eritema; Classificação 2: eritema com ligeiro edema; Classificação 3: forte inflamação sem anquilose; Classificação 4: anquilose. Apenas os animais capazes de vocalizar numa flexão suave e com uma classificação de 2 ou 3 foram incluídos no estudo.

Quatro grupos com 10 ratos cada foram incluídos no estudo. Relativamente ao grupo 1 (veículo), no dia 14 (D14), após a seleção, os ratos foram administrados intravenosamente por veículo (salina). No dia 18 (D18), a intensidade nocicetiva foi avaliada através da flexão suave da pata traseira, e a intensidade do nível de vocalização foi registada para cada animal. Relativamente ao grupo 2 (4 dias), no D14, após a seleção, os ratos foram administrados intravenosamente com 911 (10 mg/kg). No dia 18 (D18), a intensidade nocicetiva foi avaliada através da flexão suave da pata traseira, e a intensidade do nível de vocalização foi registada para cada animal. Relativamente ao grupo 3 (24 horas), no dia 17, após a injeção de CFA, os ratos

foram administrados intravenosamente com 911 (10 mg/kg). A intensidade nocicetiva foi avaliada através da flexão suave da pata traseira 24 horas depois, e a intensidade do nível de vocalização foi registada para cada animal. Relativamente ao grupo 4 (indometacina), no dia 18 (D18), a intensidade nocicetiva foi avaliada através da flexão suave da pata traseira uma hora após a administração oral de indometacina (10 mg/kg). A intensidade do nível de vocalização também foi registada para cada animal. As substâncias de teste foram administradas de um modo casual e aleatório por via intravenosa num volume de 5 ml/kg, ao passo que a indometacina foi administrada por via oral num volume de 10 ml/kg.

Os efeitos analgésicos do anticorpo 911 anti-NGF são ilustrados na Tabela 10. Os resultados foram expressados para cada grupo, uma vez que a intensidade nocicetiva avaliou a intensidade do nível de vocalização registada para cada animal em mV (média \pm EPM) e a percentagem de variação da intensidade nocicetiva calculada a partir do valor médio do grupo tratado com veículo. O significado estatístico entre os grupos tratados e o grupo de veículo foi determinado com um teste de Dunnett utilizando a variância residual após uma análise de variância com um fator ($P < 0,05$).

Tabela 10. Efeitos analgésicos de 911 em artrite crónica induzida por adjuvante completo de Freund em ratos

Substâncias (Dia de dosagem)	Veículo (D14)	911 (D14)	911 (D17)	Indometacina (D18)
Dose (mg/kg)		10	10	10
Intensidade nocicetiva (mV)	971,0 \pm 116,2	234,7 \pm 34,4*	247,2 \pm 41,8*	145,8 \pm 29,9*
% de variação	-	-76	-75	-85

Os resultados são expressados como média \pm EPM
 n=10 ratos por grupo
 Dia 0 (D0): indução de Artrite crónica por administração de CFA
 Veículo: salina
 O 911 (10 mg/kg) foi administrado intravenosamente no D14 ou D17 e a medição da dor foi efetuada no D18. A indometacina (10 mg/kg) foi administrada oralmente no D18 e a medição da dor foi efetuada uma hora após a dosagem. Teste de Dunnett: * indica uma diferença significativa em comparação com o grupo tratado com veículo para $P < 0,05$

Conforme ilustrado na Tabela 10, o anticorpo 911 anti-NGF reduziu significativamente a dor num modelo de rato de artrite reumatoide 24 horas ou 4 dias após uma única administração do anticorpo.

Exemplo 8: efeitos farmacológicos do anticorpo antagonista anti-NGF E3 e 911 num modelo de rato de artrite reumatoide

Os efeitos farmacológicos (efeitos anti-inflamatórios e analgésicos) do anticorpo antagonista anti-NGF E3 e 911 foram investigados num modelo de artrite crónica induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos em comparação com a indometacina utilizada como uma substância de controlo positivo interno. Os efeitos analgésicos de E3 e 911 foram avaliados através da medição da resposta nocicetiva. Os efeitos anti-inflamatórios foram avaliados por volume da pata, índice de artrite (classificação da inflamação), peso corporal e das patas traseiras. Os níveis de citocina na pata (IL-6, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1), o TGF- β 1 em circulação no soro, as concentrações de plasma E3 e 911, os parâmetros biológicos e as radiografias de raios X foram efetuados no final da experiência.

Protocolo experimental

1. Planeamento do estudo

80 ratos machos Lewis (LEWIS Lew/Ico) (Charles River

Laboratories, Bélgica) com 5 semanas de idade foram incluídos neste estudo. Foram alojados numa sala com temperatura (19,5 a 24,5 °C) e humidade relativa (45 a 65%) controladas com um ciclo de claridade/escurecimento de 12 h, com acesso livre a água da torneira filtrada e alimentos de laboratório peletizados standardizados (SAFE, França) durante todo o estudo. Na receção nas instalações para animais, foram alojados 5 por gaiola e foi observado um período de aclimatização de 10 dias antes de quaisquer testes. Os animais foram identificados individualmente na cauda.

Cinco grupos de 10 animais cada (ratos machos Lewis com 5 semanas de idade - LEWIS Lew/Ico, de Charles River Laboratories - Bélgica) foram incluídos neste estudo: Grupo 1: ratos não artríticos/salina (veículo), bolo i.v., n=10; Grupo 2: ratos artríticos/salina (veículo), bolo i.v., n=10; Grupo 3: ratos artríticos/3 mg/kg de Indometacina, p.o diariamente durante 10 dias, n=10; Grupo 4: ratos artríticos/E3, 1 mg/kg, bolo i.v., n=10; Grupo 5: ratos artríticos/ 911, 10 mg/kg, bolo i.v., n=10. As doses foram expressadas em termos de substância ativa livre (mg/kg). O E3 e 911 foram preparados extemporaneamente em salina a partir da solução-mãe para a concentração desejada. E3 1 mg/kg: 3,41 mL de solução-mãe (0,88 mg/ml) q.s.p. 15 mL de salina. 911 10 mg/kg: 12 mL de solução-mãe (2,5 mg/ml) q.s.p. 15 mL de salina. Todas as soluções diluídas (antes da injeção i.v.) foram esterilizadas utilizando uma unidade de filtro estéril de 0,20 µm. Os valores de pH e osmolaridade das soluções diluídas foram medidos antes de cada injeção i.v. Antes da primeira i.v., a osmolaridade (mosm/L) para salina, o E3 e o 911 correspondiam a 278, 269 e 308 respetivamente; o pH para salina, o E3 e o 911 correspondiam a 5,93, 6,76 e 6,71 respetivamente. Antes da segunda i.v., a osmolaridade (mosm/L) para salina, o E3 e o 911 correspondiam a 280, 270 e 309 respetivamente; o pH

para salina, o E3 e o 911 correspondiam a 5,86, 6,72 e 6,59 respectivamente.

O E3 ou 911 ou a salina foram administrados por injeção em bolo i.v. no Dia 14 e Dia 19 após a indução de artrite numa ordem codificada e aleatória com um volume de 5 mL/kg. O grupo não artrítico recebeu salina por injeção em bolo i.v. no Dia 14 e Dia 19 com um volume de 5 mL/kg. A indometacina foi preparada extemporaneamente em 1% de metilcelulose. A indometacina foi administrada por via oral (p.o.) uma vez por dia durante 10 dias do Dia 14 ao Dia 23 após a indução de artrite numa ordem codificada e aleatória com um volume de 10 mL/kg.

2. Indução de artrite

No Dia 0 (D0), a artrite foi induzida em 70 ratos por injeção intradermal na cauda de 0,05 ml de uma suspensão de micobactéria butírica. Um grupo de 10 ratos não recebeu nenhuma injeção intradermal (ratos não artríticos). No Dia 14 (D14), os ratos artríticos foram incluídos no estudo utilizando os seguintes critérios: todos os ratos incluídos apresentaram um aumento do volume médio da pata (média do volume da pata esquerda e direita) de, pelo menos, 0,30 ml em comparação com o volume médio da pata (média do volume da pata esquerda e direita) no grupo não artrítico (medição do volume da pata conforme descrito abaixo); todos os ratos incluídos apresentaram uma vocalização na flexão suave (mediação da resposta nocicetiva conforme descrito abaixo); e todos os ratos incluídos apresentaram uma classificação de índice de artrite de 2 a 3 em cada pata traseira (mediação do índice de artrite conforme descrito abaixo) (os animais com uma classificação de 0, 1 ou 4 foram excluídos).

3. Peso corporal

Os animais foram pesados uma vez por dia do Dia 0 ao Dia 24 (exceto durante os dias de fim de semana antes do tratamento: D1, D2, D8, D9, D10). Todas as medições foram

efetuadas entre as 9:00 h e 12:00 h, exceto no D14 (7:30 h e 9:00 h) e no D24 (7:30 h e 8:00 h).

3. Medição do volume da pata

O volume da pata traseira direita e esquerda de cada rato (ratos artríticos e não artríticos) foi medido utilizando um pletismómetro. As medições foram efetuadas nos tempos seguintes (após a indução de artrite): Dia 14 (antes de bolo i.v. ou administração p.o.); e Dia 24 (5 dias após a última injeção em bolo i.v. ou 24 h após a última administração p.o.). Todas as medições foram efetuadas entre as 9:00 h e 12:00 h. Todos os dados foram recolhidos e armazenados através do software WinDas.

4. Índice de artrite

O índice de artrite foi avaliado utilizando uma classificação de inflamação para cada pata traseira e dianteira (ratos artríticos): Classificação 0: aspeto normal; Classificação 1: eritema; Classificação 2: eritema com ligeiro edema; Classificação 3: forte inflamação sem anquilose; Classificação 4: anquilose. Esta avaliação foi efetuada nos tempos seguintes (após a indução de artrite): Dia 14 (antes de bolo i.v. ou administração p.o.); e Dia 24 (5 dias após a última injeção em bolo i.v. ou 24 h após a última administração p.o.). Todas as medições foram efetuadas entre as 14:00 h e 15:00 h (D14), 8:00 h e 9:00 h (D24). Todos os dados foram recolhidos e armazenados através do software WinDas.

5. Medição da resposta nocicetiva (Teste de vocalização)

A resposta nocicetiva foi avaliada através da flexão suave da pata traseira direita e esquerda repetidamente 2 vezes em intervalos de 4 a 5 s com um dedo do cirurgião (ratos artríticos). A intensidade do nível de vocalização foi registada para cada pata traseira de cada animal (2 vezes: na pata traseira direita: s1 e s3; 2 vezes: na pata traseira esquerda: s2 e s4). Esta avaliação foi efetuada nos tempos seguintes (após a indução de artrite): Dia 14

(antes de bolo i.v. ou administração p.o.); Dia 18 (antes da segunda injeção em bolo i.v. ou 1 h após a administração p.o.); e Dia 24 (5 dias após a última injeção em bolo i.v. ou 24 h após a última administração p.o.). Todas as medições foram efetuadas entre as 9:00 h e 12:00 h, exceto no D14 (7:30 h e 9:00 h) e no D24 (7:30 h e 9:00 h).

6. Recolha de sangue para medição da concentração de E3 ou 911 e do TGF- β 1 em circulação e dos parâmetros hematológicos

No Dia 24 (após as medições do volume da pata e do índice de artrite e a vocalização de teste), sob anestesia geral utilizando isoflurano (numa mistura de oxigénio e óxido nitroso), as amostras de sangue (cerca de 800 a 1000 μ l) foram recolhidas através de ação capilar com uma micropipeta a partir do seio retro-orbital.

Medição da concentração de E3 ou 911 (grupos 2, 4 e 5): uma parte da amostra de sangue foi recolhida em tubos que contêm Li-Heparina (mantida no gelo) e centrifugada em 2500 a 3000 g durante 10 min. As amostras de plasma (pelo menos 100 μ L) foram obtidas, congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80 °C. Uma amostra foi ligeiramente hemolisada (rato artrítico tratado com veículo N.º 36).

Medição do TGF- β 1 em circulação (grupos 1-2-3-4-5): uma parte da amostra de sangue foi colhida em microtubos para preparação de soro à temperatura ambiente. A seguir à recolha de sangue, o sangue foi misturado e pôde coagular durante 30 minutos antes da centrifugação. Os tubos foram centrifugados em cerca de 6000 g durante 3 minutos. Cada amostra de soro (pelo menos 100 μ L, exceto para o rato N.º 52 e N.º 53) foi fracionada e armazenada a -20 °C até a ativação da amostra para a análise de TGF- β 1. Estas alíquotas (50 frascos) foram mantidas durante um período de 6 meses a começar a partir do final do estudo. Algumas amostras foram ligeiramente hemolisadas (rato não artrítico tratado com veículo: N.º 2, N.º 5, N.º 9, N.º 10; rato

artrítico tratado com veículo: N.º 53, N.º 63; rato artrítico tratado com E3 N.º 31, N.º 51; rato artrítico tratado com 911: N.º 52, N.º 62, N.º 64). Os níveis de TGF- β 1 foram medidos utilizando um kit ELISA TGF- β 1 humano (ref. DB100, Lote 212258 e 213610, R&D Systems - França).

Recolha de sangue para parâmetros hematológicos (grupos 1-2-3-4-5: 50 frascos): uma parte da amostra de sangue foi recolhida em tubos que contêm K3 - EDTA (pelo menos 100 μ L). A determinação dos parâmetros foi efetuada no dia da recolha e as amostras não foram armazenadas. Os parâmetros hematológicos, incluindo glóbulos vermelhos do sangue, glóbulos brancos do sangue, plaquetas, hemoglobina e hematócrito, foram medidos com um contador de células de hematologia (D24). Alguns parâmetros hematológicos não foram medidos devido às amostras coaguladas (rato não artrítico tratado com veículo: N.º 10; ratos artríticos tratados com E3: N.º 59, N.º 67; ratos artríticos tratados com 911: N.º 16).

7. Níveis de citocina na pata

No Dia 24 (5 dias após a última injeção em bolo i.v. ou 24 horas após a última administração p.o.) (após as radiografias de raios X), a pata traseira de cada animal (ratos artríticos ou não artríticos) foi pesada e recolhida num frasco de polietileno rotulado. As amostras de tecido foram congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80 °C.

Preparação das substâncias homogeneizadas da articulação: as patas traseiras congeladas foram pulverizadas utilizando um Biopulverizador. Em seguida, as patas traseiras pulverizadas foram colocadas num tubo de centrifugação cónico de 50 ml com 3 ml de PBS complementado com 50 μ l de mistura antiprotease e homogeneizado no gelo utilizando o homogeneizador Ultra-Turrax (50% da velocidade máxima). As substâncias homogeneizadas foram depois centrifugadas em 2000 x g durante 15 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram filtrados através de filtros Sartorius

de 0,2 μm ; fracionados e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à utilização.

Medição dos níveis de citocina: os níveis de citocina de TNF- α (kit ELISA TNF- α de rato, ref. RTA00, Lote 213718, R&D Systems, França), IL-1 β , kit ELISA IL-1 β de rato, ref. RLB00, Lote 212435, R&D Systems, França), IL-6, kit ELISA IL-6 de rato, ref. R6000, Lote 211773, 214008 e 214362, R&D Systems, França), e TGF-11, kit ELISA TGF- β 1 humano, ref. DB100, Lote 212258 e 213610, R&D Systems, França) foram determinados em duplicado, de acordo com o procedimento do fabricante. As alíquotas das substâncias homogeneizadas da pata traseira foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8. Análise de raios X

No Dia 24, após a recolha de sangue, os animais foram sacrificados e foram obtidas radiografias de raios X (patas traseiras) para a estimativa das lesões da articulação. A análise de raios X focou-se nas erosões articulares, espaço articular e anormalidades do perióstio em ambas as patas traseiras. Todas as radiografias foram analisadas observando sete itens diferentes: lesão no tecido mole, deformidade, desmineralização, espaço da articulação, erosões, osteogénese e reação periostal. Para cada animal, os primeiros seis itens foram analisados independentemente observando a pata traseira pior. A reação periostal foi analisada observando a cauda. Para cada item, a classificação varia entre 0 (normal) e 4 (lesão máxima). Por conseguinte, a classificação total varia entre 0 e 28. A interpretação radiográfica foi efetuada pelo mesmo leitor sem saber nada sobre os animais (tratados ou não tratados).

9. Observações

Um animal (N.º 65) morreu no D23 após a administração de indometacina (antes da administração no D23) devido a uma causa desconhecida.

10. Análise e expressão dos resultados

Todos os resultados foram declarados como Média \pm EPM

de 10 ratos de cada grupo em cada momento. O volume da pata foi expressado em ml calculados a partir do valor médio do volume da pata direita e esquerda. O índice de artrite foi calculado a partir da soma da classificação obtida para cada uma das 4 patas. A resposta nocicetiva foi avaliada através da intensidade do nível de vocalização registada para cada animal (média de 4 valores: 2 vezes/pata) em mV. A percentagem de inibição da resposta nocicetiva foi calculada a partir do valor médio do grupo artrítico tratado com veículo [(valor médio do grupo artrítico tratado com veículo/valor médio do grupo artrítico tratado/valor médio do grupo artrítico tratado com veículo)* 100]. O peso corporal foi expressado em gramas. O peso das patas traseiras (esquerda e direita) foi expressado em gramas. Os níveis de citocina (IL-6, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1) de cada pata traseira foram expressados em pg/ml. Os níveis de circulação de TGF- β 1 foram expressados em pg/ml. O índice radiológico para cada parâmetro (desmineralização, erosões, ração periostal, lesão do tecido mole, espaço da articulação, osteogénese, deformidade) e o índice radiológico total (classificação total) foram calculados a partir da soma das classificações obtidas para cada parâmetro. Os significados intergrupo dos desvios entre os valores do grupo tratado com veículo (ratos artríticos) e do grupo tratado com veículo (ratos não artríticos) foram estimados através do teste t de Student t ou do Teste de Mann-Whitney quando o teste de normalidade ou variância igual falhou. Os significados intergrupo dos desvios entre os valores do grupo tratado com veículo (ratos artríticos) e dos grupos tratados com E3 e 911 e Indometacina foram estimados através da análise de variância a 1 fator ANOVA seguida do teste t de Dunnett não emparelhado. Uma probabilidade de $P \leq 0,05$ foi considerada como significativa. Toda a análise estatística foi efetuada através do software Sigmastat™.

Resultados

1. Resposta nocicetiva (teste de vocalização)

Conforme ilustrado na Tabela 11 e na Figura 18, no D14, a resposta nocicetiva foi 4147 ± 331 , 4386 ± 235 , 4644 ± 367 e 4468 ± 143 nos grupos artríticos tratados com veículo, indometacina, E3 e 911, respectivamente. A indometacina diminuiu forte e significativamente a resposta nocicetiva após 3 mg/kg/dia p.o. (durante 10 dias) em cerca de -3768 mV (% de inibição: 71 %) e -4353 mV (% de inibição: 74 %) no D18 e D24, respectivamente, em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo (D18: 1511 ± 398 vs 5279 ± 326 mV; D24: 1552 ± 508 vs 5905 ± 345 mV). O E3 (1 mg/kg i.v. no D14 e D19) diminuiu forte e significativamente a resposta nocicetiva em cerca de -4167 mV (% de inibição: 79 %) e -5905 mV (% de inibição: 100 %) no D18 e D24, respectivamente, em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo (D18: 1112 ± 401 vs 5279 ± 326 mV; D24: 0 ± 0 vs 5905 ± 345 mV). O 911 (10 mg/kg i.v. 2 dias no D14 e D19) diminuiu forte e significativamente a resposta nocicetiva em cerca de -3932 (% de inibição: 74 %) e -5358 mV (% de inibição: 91 %) no D18 e D24, respectivamente, em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo (D18: 1347 ± 492 vs 5279 ± 326 mV; D24: 547 ± 307 vs 5905 ± 345 mV).

Tabela 11. Efeitos do E3 e 911 após injeção i.v. (2 dias: D14 e D19) na resposta nocicetiva na artrite reumatoide em ratos

	Dia	D14	D18	D24
Ratos Artríticos	veículo i.v.	4147±331	5279±326	5905±345
	E3	4644±367	1112±401*	0±0*
	1 mg/kg i.v.			
	% de inibição	0	79	100
	911	4468 i.v.±143	1347±492*	547±307*
	10 mg/kg			
	% de inibição	0	74	91

	Dia	D14	D18	D24
	Indometacina 3 mg/kg p.o. (durante 10 dias)	4386±235	1511±398*	1552±508
	% de inibição	0	71	74

Os valores são expressados em mV como Média ± EPM

n=10 animais por grupo exceto no D24 para Indometacina (n=9)

Teste t de Dunnett: * $P \leq 0,05$ vs ratos artríticos tratados com veículo

2. Peso corporal

Conforme ilustrado na Tabela 12 e na Figura 19, foi observada uma diminuição acentuada no aumento de peso corporal nos ratos artríticos em comparação com os ratos não artríticos do D0 ao D14 devido ao estabelecimento da artrite. No D14 (dia de seleção), os ratos artríticos apresentaram uma diminuição significativa no peso em comparação com os ratos não artríticos (289 ± 2 vs 217 ± 4 g) (teste t de Student $P < 0,05$). Contudo, não foi detetada nenhuma diferença significativa no peso (D14) em todos os grupos artríticos (teste t de Dunnett $P > 0,05$). O peso corporal aumentou moderada e significativamente no grupo tratado com Indometacina (3 mg/kg/dia durante 10 dias) do D17 ao D24 com um máximo de cerca de 43 g no D24 em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo (261 ± 5 vs 218 ± 3 g). Após o tratamento com E3 (1 mg/kg i.v. no D14 e D19), o peso corporal aumentou moderada e significativamente do D17 ao D24 com um máximo de cerca de 46 g no D24 em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo (264 ± 5 g vs 218 ± 3 g). Após o tratamento com 911 (10 mg/kg i.v. no D14 e D19), o peso corporal aumentou moderada e significativamente do D18 ao D24 com um máximo de cerca de 47g no D24 em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo (265 ± 7 vs 218 ± 3 g).

Tabela 12. Efeitos do E3 e 911 após a injeção i.v. (2 dias: D14 e D19) no peso corporal na artrite reumatoide em ratos

	Dia	D0	D3	D4	D5	D6	D7	D11	D12	D13	D14
Ratos Não Artríticos	veículo i.v.	197±2	215±2	222±2	232±2	236±2	244±2	272±2	277±2	282±2	289±2
Ratos Artríticos	veículo i.v.	199±2	214±2	221±2	230±2	236±2	241±3	229±6	223±5	218±5	217±4
	E3 1 mg/kg i.v.	206±4	222±3	230±3	241±3	243±3	249±3	242±6	237±6	230±5	225±5
	911 10 mg/kg i.v.	201±2	±5211	±5218	±5227	±5231	±5239	±8234	±7228	221±7	218±6
	Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 dias	202±3	217±4	225±4	235±4	239±4	246±4	242±7	235±7	227±6	224±5
	Dia	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24
Ratos Não Artríticos	veículo i.v.	285±2	291±2	297±2	302±3	307±3	308±3	312±3	316±3	321±3	326±3
Ratos Artríticos	veículo i.v.	213±4	212±4	211±3	210±3	208±3	210±3	212±3	214±3	216±3	218±3
	E3 1 mg/kg i.v.	223±5	224±5	227±4*	232*±4	235*±4	238*±4	245±4*	250±5*	257±5*	264±5*
	911 10 mg/kg i.v.	217±5	221±5	226±5	229±5*	233±6*	239±6*	246±6*	253±6*	258±6*	265±7*
	Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 dias	230±4	230±5	231±4*	234±4*	236±4*	241±4*	246±4*	248±5*	253±5*	261±5*

Os valores são expressados em gramas como Média ± EPM n=10 animais por grupo exceto no D23 e D24 (n=9) para Indometacina

Teste t de Dunnett: * P ≤ 0,05 vs ratos artríticos tratados com veículo

3. Volume da pata

No D14, foi efetuada uma seleção aleatória para obter grupos homogêneos em termos de volume da pata. Conforme ilustrado na Tabela 13, no D14, o volume da pata traseira (média do volume da pata direita e esquerda) era significativamente maior no grupo artrítico do que no grupo não artrítico ($2,10 \pm 0,05$ vs $1,44 \pm 0,02$ mL (teste t de Student $P < 0,05$)). A indometacina (3 mg/kg/dia p.o. durante 10 dias) diminuiu significativamente o volume da pata em cerca de $-0,75$ mL (D 24) em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo ($1,59 \pm 0,03$ mL vs $2,34 \pm 0,08$ mL). O E3 (1 mg/kg i.v. no D14 e D19) aumentou ligeira e significativamente o volume da pata em cerca de $0,37$ mL em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo ($2,71 \pm 0,09$ mL vs $2,34 \pm 0,08$ mL). O 911 (10 mg/kg i.v. no D14 e D19) aumentou ligeira e significativamente o volume da pata em cerca de $0,36$ mL em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo ($2,70 \pm 0,11$ mL vs $2,34 \pm 0,08$ mL).

Tabela 13. Efeitos do E3 e 911 após a injeção i.v. (2 dias: D14 e D19) no volume da pata na artrite reumatoide em ratos

	Dia	D14	D24
Ratos Não Artríticos	veículo i.v.	$1,44 \pm 0,02$	$1,47 \pm 0,02$
Ratos Artríticos	veículo i.v.	$2,10 \pm 0,05$	$2,34 \pm 0,08$
	E3 1 mg/kg i.v.	$2,06 \pm 0,03$	$2,71 \pm 0,09^*$
	911 10 mg/kg i.v.	$2,02 \pm 0,07$	$2,70 \pm 0,11^*$
	Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 dias	$2,08 \pm 0,06$	$1,59 \pm 0,03^*$

Os valores são expressados em mL como Média \pm EPM

n=10 animais por grupo exceto no D24 para Indometacina (n=9)

Teste t de Dunnett: * $P \leq 0,05$ vs ratos artríticos tratados com veículo

4. Índice de artrite

Conforme ilustrado na Tabela 14, no D14, o índice de artrite era $10,1 \pm 0,8$, $8,7 \pm 0,6$, $10,2 \pm 0,4$ e $9,4 \pm 0,7$ e nos grupos artríticos tratados com veículo, indometacina, E3 e 911, respectivamente. A indometacina diminuiu forte e significativamente o índice de artrite após 3 mg/kg/dia p.o. (durante 10 dias) num máximo de cerca de -8,0 em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo ($2,7 \pm 0,7$ vs $10,7 \pm 0,6$). O E3 (1 mg/kg i.v. no D14 e D19) não afetou o índice de artrite em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo ($11,4 \pm 0,4$ vs $10,7 \pm 0,6$). O 911 (10 mg/kg i.v. no D14 e D19) não afetou o índice de artrite em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo ($10,9 \pm 0,7$ vs $10,7 \pm 0,6$).

Tabela 14. Efeitos do E3 e 911 após a injeção i.v. (2 dias: D14 e D19) no índice de artrite na artrite reumatoide em ratos

	Dia	D14	D24
Ratos Artríticos	veículo i.v.	10,1±0,8	10,7±0,6
	E3 1 mg/kg i.v.	10,2±0,4	11,4±0,4
	911 10 mg/kg i.v.	9,4±0,7	10,9±0,7
	Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 dias	8,7±0,6	2,7±0,7*

Os valores são expressados como Média ± EPM (classificação)

n=10 animais por grupo exceto para Indometacina (n=9)

Teste *t* de Dunnett: * $P \leq 0,05$ vs ratos artríticos tratados com veículo

5. Níveis de citocina na pata

Conforme ilustrado na Tabela 15, no D24, os níveis de citocina nas patas esquerda e direita foram aumentados no grupo artrítico tratado com veículo num máximo de cerca de 3,5 (IL-1 β), 4 (TNF- α) e 1,8 (TGF- β 1) dobras em comparação com o grupo não artrítico tratado com veículo. Não foi observada nenhuma diferença significativa para os níveis

IL-6, na pata direita e esquerda, entre os dois grupos. Os níveis de citocina do grupo artrítico eram semelhantes na pata esquerda e direita: 259,7 ± 38,5 vs 219,2 ± 32,4, 4802,8 ± 365,5 vs 4007,1 ± 380,4, 17,8 ± 1,6 vs 18,6 ± 1,9 e 9735,0 ± 1219,8 vs 9161,4 ± 846,1 pg/ml para IL-6, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1 respetivamente. A indometacina diminuiu ligeira, mas significativamente, o nível TGF- β 1 na pata direita após 3 mg/kg/dia p.o. (durante 10 dias) em cerca de 1,3 vezes, em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo (7057,4 ± 335,6 vs 9161,4 ± 846,1), ao passo que não modificou os níveis IL-6, TNF- α ou IL-1 β . Foi observado um efeito semelhante, mas não significativo, na pata esquerda. O E3 (1 mg/kg i.v. no D14 e D19) não afetou os níveis IL-6, IL-1 β , TNF- α ou TGF- β 1, em ambas as patas, em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo. O 911 (10 mg/kg i.v. no D14 e D19) aumentou o nível IL-1 β na pata direita em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo (6215,3 ± 666,7 vs 4007,1 ± 380,4). Não teve nenhum efeito noutros níveis de citocina em ambas as patas.

Tabela 15. Efeito do E3 e 911 após a injeção i.v. (2 dias no D14 e D19) nos níveis de citocina na pata em ratos artríticos reumatóides

<i>Níveis de citocina da pata esquerda</i>					
<i>Ratos Não Artríticos</i>		<i>Ratos Artríticos</i>			
	<i>veículo i.v.</i>	<i>veículo i.v.</i>	<i>E3 1 mg/kg i.v.</i>	<i>911 10 mg/kg i.v.</i>	<i>Indometacina 3 mg/kg p.o.</i>
IL-6	298,6±35,6	259,7±38,5	234,4±35,2	262,5±42,5	249,7±60,4
IL-1β	1383,0±57,9	4802,8±365,5	5060,0±473,5	5500,8±625,3	4029,1±449,9
TNF-α	4,3±2,9	17,8±1,6	23,6±2,5	29,9±4,8	29,9±3,6
TGF-β1	5264,7±209,2	9735,0±1219,8	9796,7±491,2	11053,5±713,3	7708,2±293,9

Níveis de citocina da pata direita

Ratos Não Artríticos		Ratos Artríticos			
veículo i.v.		veículo i.v.	E3 1 mg/kg i.v.	911 10 mg/kg i.v.	Indometacina 3 mg/kg p.o.
IL-6	286,4±76,1	219,2±32,4	214,6±47,2	284,9±38,9	295,9±47,8
IL-1β	1342,1±86,1	4007,1±380,4	4853,5±605,0	6215,3±666,7*	3884,4±534,4
TNF-α	15,7±4,8	18,6±1,9	21,5±2,5	33,4±5,7	30,6±5,7
TGF-β1	5024,8±148,4	9161,4±846,1	9362,7±423,4	10861,2±604,6	7057,4±335,6*

Os valores são expressados em pg/ml, como Média ± EPM

n=10 animais por grupo exceto para Não artrítico/veículo (Pata direita), Artrítico/veículo (Pata esquerda) e Indometacina (n=9)

Teste t de Dunnett: * P ≤ 0,05 vs ratos artríticos tratados com veículo

6. Medição do TGF-β1 em circulação

Conforme ilustrado na Tabela 16, no D24, o nível NGF-β1 de soro foi aumentando no grupo artrítico tratado com veículo em comparação com o grupo não artrítico tratado com veículo (81715,7 ± 1984,1 vs 60269,9 ± 2142,8). A indometacina diminuiu significativamente o nível TGF-β1 de soro após 3 mg/kg/dia p.o. (durante 10 dias) em cerca de 1,5 vezes em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo (57222,2 ± 3194,1 vs 81715,7 ± 1984,1). O E3 (1 mg/kg i.v. no D14 e D19) e o 911 (10 mg/kg i.v. no D14 e D19) diminuíram significativamente nível TGF-β1 de soro, de modo a que o nível de citocina nos grupos tratados com E3 e 911 fossem comparáveis com os observados no grupo artrítico tratado com veículo (69408,8 ± 3926,7 e 67214,5 ± 3649,4 respectivamente, vs 60269,9 ± 2142,8).

Tabela 16. Efeito do E3 e 911 após a injeção i.v. (2 dias no D14 e D19) nos níveis TGF- β 1 de soro em ratos artríticos reumatoides

Ratos Não Artríticos		Ratos Artríticos			
veículo i.v.		veículo i.v.	E3 1 mg/kg i.v.	911 10 mg/kg i.v.	Indometacina 3 mg/kg p.o.
TGF-β1	60269,9 $\pm 2142,8$	81715,7 $\pm 1984,1$	69408,8 $\pm 3926,7^*$	67214,5 $\pm 3649,4^*$	57222,2 $\pm 3194,1^*$

Os valores são expressados em pg/ml, como Média \pm EPM

n=10 animais por grupo exceto para Não artrítico/veículo (Pata direita), Artrítico/veículo (Pata esquerda) e Indometacina (n=9)

Teste t de Dunnett: * $P \leq 0,05$ vs ratos artríticos tratados com veículo

7. Parâmetros hematológicos

Conforme ilustrado na Tabela 17, os parâmetros hematológicos, tais como glóbulos brancos do sangue e plaquetas, eram maiores nos ratos artríticos tratados com veículo em comparação com os ratos não artríticos tratados com veículo (teste t de Student $P < 0,05$), ao passo que os glóbulos vermelhos do sangue, a hemoglobina e o hematócrito (teste t de Student $P > 0,05$) não foram alterados. A indometacina não afetou os parâmetros sanguíneos após 3 mg/kg/dia p.o. (durante 10 dias) em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo. O E3 (1 mg/kg i.v. no D14 e D19) não afetou os parâmetros sanguíneos em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo. O 911 (10 mg/kg i.v. no D14 e D19) não afetou os parâmetros sanguíneos em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo.

Tabela 17. Efeitos do E3 e 911 após a injeção i.v. (2 dias no D14 e D19) nos parâmetros sanguíneos na artrite reumatoide em ratos (Medição no D24)

	Dia	Glóbulos brancos do sangue 10 ³ /mm ³	Glóbulos vermelhos do sangue 10 ⁶ /mm ³	Hemoglobina g/dl	Hematócrito %	Plaquetas 10 ³ /mm ³
Ratos Não Artríticos	veículo i.v.	8,7±0,9 n=9	7,98±0,31 n=9	15,1±0,7 n=9	42,6±1,6 n=9	322±89 n=9
Ratos Artríticos	veículo i.v.	19,0±0,9 n=10	7,54±0,31 n=10	13,2±0,7 n=10	37,4±1,6 n=10	10,43±89 n=10
	E3	19,1±1,2 n=7	7,74±0,17 n=8	12,9±0,3 n=8	38,5±1,0 n=8	827±77 n=8
	1 mg/kg i.v.					
	911	22,6±2,9 n=8	7,30±0,40 n=9	12,1±0,7 n=9	36,5±2,1 n=9	799±121 n=9
	10 mg/kg i.v.					
Ratos Artríticos	Indometacina	21,7±2,5 n=9	6,93±0,31 n=9	11,8±0,6 n=9	35,0±1,5 n=9	705±111 n=9
	3 mg/kg p.o.					
	durante 10 dias					

Os valores são expressados como Média ± EPM

Anova: P > 0,05 vs ratos artríticos tratados com veículo

7. Peso da pata traseira

Conforme ilustrado na Tabela 18, o peso das patas traseiras esquerda e direita era maior nos ratos artríticos tratados com veículo do que nos ratos não artríticos tratados com veículo (3,43 ± 0,11 vs 1,98 ± 0,01 e 3,32 ± 0,12 vs 1,99 ± 0,02 g, respectivamente) (teste t de Student ou Mann-Whitney P < 0,05). A indometacina diminuiu significativamente o peso das patas traseiras após 3 mg/kg/dia p.o. (durante 10 dias) em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo (pata traseira esquerda: 2,23 ± 0,04 vs 3,43 ± 0,11 g; pata traseira direita: 2,20 ± 0,05 vs 3,32 ± 0,12 g). O E3 (1 mg/kg i.v. no D14 e D19) apenas

aumentou significativamente o peso da pata traseira esquerda em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo (pata traseira esquerda: $3,86 \pm 0,14$ vs $3,43 \pm 0,11$ g; pata traseira direita: $3,72 \pm 0,13$ vs $3,32 \pm 0,12$ g). O 911 (10 mg/kg i.v. no D14 e D19) apenas aumentou significativamente o peso da pata traseira direita em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo (pata traseira esquerda: $3,73 \pm 0,12$ vs $3,43 \pm 0,11$ g; pata traseira direita: $3,83 \pm 0,15$ vs $3,32 \pm 0,12$ g).

Tabela 18. Efeitos do E3 e 911 após a injeção i.v. (2 dias no D14 e D19) no peso das patas traseiras na artrite reumatoide em ratos (Medição no D24)

		Pata esquerda	Pata direita
Ratos Não Artríticos	veículo i.v.	1,98±0,01	1,99±0,02
Ratos Artríticos	veículo i.v.	3,43±0,11	3,32±0,12
	E3	3,86±0,14*	3,72±0,13
	1 mg/kg i.v.		
	911	3,73±0,12	3,83±0,15*
	10 mg/kg i.v.		
	Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 dias	2,23±0,04*	2,20±0,05*

Os valores são expressados em gramas como Média ± EPM

n=10 animais por grupo exceto para Indometacina (n=9)

Teste t de Dunnett: * $P \leq 0,05$ vs ratos artríticos tratados com veículo

8. Análise de raios X

Conforme ilustrado na Tabela 19, foi observada uma classificação total de $0,0 \pm 0,0$ nos ratos não artríticos tratados com veículo. Os ratos artríticos tratados com veículo têm uma classificação total de $15,1 \pm 1,3$ com classificações altas para desmineralização ($2,4 \pm 0,3$), erosões ($2,7 \pm 0,3$), lesão do tecido mole ($3,1 \pm 0,2$) e espaço da articulação ($3,3 \pm 0,2$), e uma classificação moderada para reação periostal ($1,0 \pm 0,3$), osteogênese

($0,8 \pm 0,2$) e deformidade ($1,8 \pm 0,2$). A indometacina (3 mg/kg/dia p.o. durante 10 dias) diminuiu forte e significativamente a classificação total em cerca de 10,7 em comparação com ratos artríticos tratados com veículo ($4,4 \pm 0,9$ vs $15,1 \pm 1,3$). O E3 (1 mg/kg i.v. no D14 e D19) não afetou a classificação total em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo ($14,2 \pm 1,3$ vs $15,1 \pm 1,3$). O 911 (10 mg/kg i.v. no D14 e D19) não afetou a classificação total em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo ($15,4 \pm 1,0$ vs $15,1 \pm 1,3$).

Tabela 19. Efeitos do E3 e 911 após a injeção i.v. (2 dias no D14 e D19) nos parâmetros de raios X na artrite reumatoide em ratos

Dia	Desmineralizaçã o	Erosões	Reação periosta	Lesão do tecido mole	Espaço da articulaçã o	osteogénes e	Deformidad e	Classificaçã o TOTAL	
Ratos Não Artríticos	veículo i.v.	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	
Ratos Artríticos	veículo i.v.	2,4±0,3	2,7±0,3	1,0±0,3	3,1±0,2	3,3±0,2	0,8±0,2	1,8±0,2	15,1±1,3
	E3 1 mg/kg i.v.	2,0±0,2	2,4±0,3	0,8±0,2	3,3±0,3	2,7±0,2	1,2±0,2	1,8±0,2	14,2±1,3
	911 10 mg/kg i.v.	2,3±0,3	2,5±0,2	1,0±0,3	3,4±0,2	3,3±0,2	0,9±0,2	2,0±0,2	15,4±1,0
	Indometacin a 3 mg/kg p.o.	0,3±0,2*	0,9±0,2 *	0,7±0,3 *	1,0±0,2	1,0±0,2*	0,1±0,1	0,4±0,2*	4,4±0,9*

Os valores são expressados como Média ± EPM (classificação).

n=10 animais por grupo exceto para Indometacina (n=9)

Teste t de Dunnett: * $P \leq 0,05$ vs ratos artríticos tratados com veículo

Conclusão

Nas condições experimentais descritas acima, o E3 (1 mg/kg i.v. 2 dias: D14 e D19) e o 911 (10 mg/kg i.v. 2 dias: D14 e D19) mostraram efeitos analgésicos fortes, mas não mostraram efeitos anti-inflamatórios significativos neste modelo de artrite.

Exemplo 9 Efeitos de doses diferentes de anticorpo E3 anti-NGF num modelo de rato de artrite reumatoide

A capacidade do E3 para produzir redução na dor nos ratos artríticos foi ainda investigada através da verificação da relação da resposta à dose entre a administração de E3 e a redução da dor. Os ratos foram tratados com adjuvante para induzir artrite conforme descrito acima. Dez ratos não injetados com adjuvante foram utilizados como controlos não artríticos. Catorze dias após a injeção de adjuvante, os animais foram classificados no estudo com base nos critérios indicados acima, selecionados aleatoriamente em oito grupos de dez ratos e testados relativamente à intensidade da respetiva resposta de vocalização. Em seguida, receberam uma dose no dia 14 com salina, ou 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg ou 5 mg/kg de anticorpo E3 conforme descrito acima. Os animais foram testados relativamente à respetiva resposta de vocalização nos dias 16, 18, 20 e 24. Os animais receberam uma nova dose com salina ou a mesma dose de E3 no dia 18 após a resposta de vocalização. Os animais foram igualmente pesados todos os dias, a começar no dia 14. Deste modo, os animais receberam uma dose duas vezes com uma determinada dose de anticorpo ou salina nos dias 14 e 18, e foram estimados relativamente à dor cinco vezes nos dias 14, 16, 18, 20 e 24. Os dados são ilustrados nas Tabelas 20 a 22 e nas Figuras 20 a 22.

Tabela 20. Efeitos de doses diferentes de E3 na resposta nocicetiva (intensidade de vocalização) em ratos artríticos reumatoides. Os valores de intensidade de vocalização são expressados em mV como média \pm EPM

	veículo	0,003 mg/kg	0,01 mg/kg	0,03 mg/kg	0,1 mg/kg	0,3 mg/kg	1,0 mg/kg	5,0 mg/kg	
dia 14	média EPM	112925 143,06	981,75 71,00	1007,28 66,50	963,18 62,12	1159,30 132,76	1191,58 123,44	1067,00 69,73	896,25 57,53
dia 16	média EPM	1042,85 130,51	825,60 57,94	576,88 49,71	448,43 81,01	283,71 60,00	151,85 26,08	98,62 29,17 79,18 27,30	
dia 18	média EPM	968,10 117,85	427,43 48,55	334,45 35,10	292,52 52,36	262,96 62,32	194,19 53,56	174,13 88,61	200,42 120,15
dia 20	média EPM	942,18 100,69	448,00 33,73	313,13 61,98	209,48 24,43	79,74 33,18	66,27 31,34 71,23 42,37	63,57 23,47	
dia 24	média EPM	913,68 131,29	724,50 115,90	596,38 44,76	513,60 63,67	432,45 70,38	176,32 66,61	19,21 10,14 12,35 12,35	

O efeito de tratar animais com várias doses de anticorpo E3 anti-NGF na vocalização induzida por dor (dados ilustrados na Tabela 20) foi analisado estatisticamente utilizando ANOVA a dois fatores para comparar os resultados obtidos aos pares entre os animais artríticos tratados com veículo com os dos tratados com uma determinada dose de anticorpo E3. Foi observado um efeito altamente significativo em todos os níveis do E3 testado ($p < 0,0001$). Mesmo na dose menor testada (0,003 mg/kg de E3), a diferença na vocalização foi significativa ($p < 0,0001$).

Conforme ilustrado na Tabela 20 e na Figura 20, de acordo com as experiências acima, o tratamento com o anticorpo E3 em 1 mg/kg mostrou um alívio rápido e forte da dor. Em dois dias (o primeiro momento testado) a intensidade de vocalização caiu perto de 90%. O tratamento com concentrações menores de E3 forneceu igualmente um alívio forte da dor, embora em doses menores o alívio da dor tenha demorado um pouco mais de tempo a aparecer. É provável que a diminuição evidente na eficácia no dia 24 de todas as doses testadas, menos das mais elevadas, se deva a uma diminuição no nível real de plasma E3 secundário para uma resposta imunitária da parte dos ratos expostos. É evidente que as doses com apenas 0,003 mg/kg fornecem, pelo menos, um alívio parcial da dor neste modelo.

Tabela 21. Efeitos de doses diferentes de E3 no peso corporal em ratos artríticos reumatóides (normalizado no dia 14).

Dia	Não Artrítico		veículo		0,003 mg/kg		0,01 mg/kg		0,03 mg/kg	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
14	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
15	99,53	0,30	99,14	0,37	99,20	0,48	99,18	0,43	100,34	0,36
16	102,52	0,45	99,57	0,60	99,58	0,79	99,33	0,72	100,89	0,57
17	103,31	0,41	99,50	0,64	100,46	0,77	99,69	0,73	101,80	0,82
18	106,11	0,72	100,26	0,93	100,90	1,19	100,69	0,72	102,70	0,92
20	109,62	0,85	101,46	1,22	102,26	1,58	102,70	1,07	104,51	0,75
21	110,52	0,93	102,73	1,49	103,16	1,87	102,63	1,18	105,08	0,98
23	114,28	1,19	104,54	1,92	106,09	1,67	104,41	1,33	106,14	1,06
24	115,44	1,15	105,12	1,92	106,16	1,90	104,23	1,46	106,23	1,26

Dia	0,1 mg/kg		0,3 mg/kg		1,0 mg/kg		5,0 mg/kg	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
14	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
15	99,83	0,59	101,05	0,38	100,53	0,37	101,61	0,41
16	101,07	0,82	102,88	0,50	102,95	0,56	104,09	0,60
17	101,89	1,12	104,76	0,70	105,74	0,76	106,85	0,79
18	103,69	1,47	107,11	0,78	108,46	0,82	109,53	1,00
20	107,36	1,78	111,26	0,77	113,57	0,83	115,32	1,11
21	108,50	2,01	113,31	0,87	116,71	0,92	119,11	1,21
23	109,25	2,15	115,59	1,38	123,35	1,13	126,36	1,94
24	108,77	2,08	115,58	1,43	124,41	1,00	127,25	1,79

Tabela 22. Efeitos de doses diferentes de E3 no peso corporal em ratos artríticos reumatóides (normalizado no dia 0).

Dia	Não Artrítico		veículo		0,003 mg/kg		0,01 mg/kg		0,03 mg/kg	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
0	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
1	100,45	0,19	98,34	0,48	98,37	0,35	98,86	0,33	98,67	0,34
2	105,94	0,33	101,75	0,71	102,47	0,59	102,61	0,40	102,05	0,53
3	109,29	0,33	105,04	1,04	106,54	0,99	106,29	0,60	105,31	0,85
4	113,13	0,46	109,14	1,15	110,09	0,72	110,61	0,41	109,24	0,82
7	124,15	0,70	119,90	1,39	121,29	1,32	121,59	0,72	117,15	1,36
8	127,82	0,80	123,38	1,52	124,44	1,43	124,47	1,24	118,52	1,89
9	132,40	0,80	125,50	1,59	125,91	1,69	125,82	1,95	118,60	2,62
10	135,91	0,83	123,51	1,77	123,30	2,47	123,87	2,59	115,26	3,19
11	140,42	1,13	119,82	1,98	119,55	2,76	121,20	2,99	112,94	3,48
14	152,59	1,72	111,79	1,40	111,50	1,87	111,80	1,65	108,37	2,75
15	151,87	1,87	110,82	1,41	110,63	2,05	110,85	1,44	108,68	2,45
16	156,47	2,25	111,33	1,74	111,08	2,32	110,98	1,31	109,21	2,16
17	157,65	2,08	111,24	1,62	112,06	2,36	111,42	1,66	110,16	2,03
18	161,98	2,71	112,16	2,21	112,60	2,78	112,54	1,64	111,14	2,11
20	167,36	2,93	113,49	2,37	114,17	3,24	114,82	2,12	113,17	2,49
21	168,73	3,07	114,93	2,62	115,25	3,68	114,76	2,30	113,80	2,68
23	174,51	3,54	116,96	3,02	118,48	3,49	116,76	2,51	114,93	2,62
24	176,27	3,50	117,63	3,13	118,58	3,71	116,56	2,57	114,99	2,51

Dia	0,1 mg/kg		0,3 mg/kg		1,0 mg/kg		5,0 mg/kg	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
0	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
1	99,31	0,61	99,26	0,28	98,81	0,27	98,25	0,58
2	102,87	0,73	102,98	0,43	103,18	0,50	101,82	0,53
3	106,26	0,82	106,95	0,50	106,52	0,55	105,47	0,58
4	110,20	0,64	110,50	0,58	110,52	0,67	109,29	0,58
7	120,50	1,20	120,03	0,82	121,54	1,15	119,77	1,19
8	123,48	1,58	121,38	1,31	124,28	1,59	121,96	1,72
9	125,46	2,47	121,57	2,09	125,60	2,23	123,04	2,42
10	123,95	3,38	118,27	3,07	124,11	2,97	120,00	2,81
11	121,98	3,93	116,02	3,32	121,27	3,42	117,97	2,98
14	113,90	2,14	108,43	1,94	111,72	2,27	111,58	2,59
15	113,66	1,91	109,59	2,12	112,30	2,23	113,33	2,37
16	115,06	2,00	111,54	2,02	115,00	2,36	116,06	2,30
17	115,99	2,18	113,57	2,04	118,08	2,32	119,14	2,42
18	118,01	2,29	116,13	2,14	121,16	2,55	122,14	2,61
20	122,17	2,57	120,62	2,20	126,90	2,87	128,60	2,77
21	123,49	2,90	122,88	2,49	130,41	2,98	132,82	2,84
23	124,35	3,02	125,36	2,83	137,81	3,09	140,79	2,83
24	123,77	2,80	125,33	2,75	138,93	2,76	141,77	2,61

O efeito de tratar animais com várias doses de anticorpo E3 anti-NGF no peso corporal foi analisado estatisticamente utilizando ANOVA a dois fatores para comparar os resultados obtidos aos pares entre os animais artríticos tratados com veículo com os dos tratados com uma determinada dose de anticorpo E3. Através da utilização de dados normalizados para o peso no dia 14 (Tabela 21), as doses de 0,03 mg/kg de E3 resultaram numa alteração significativa no peso corporal ($p < 0,005$). Em todas as doses mais elevadas de E3, a diferença entre animais artríticos tratados e não tratados foi significativa ($p = \text{ou} < 0,0001$). Através da utilização de dados normalizados para o peso no

dia 0 (Tabela 22), a dose de 0,03 mg/kg de E3 resultou numa alteração significativa no peso corporal ($p < 0,002$). Em todas as doses mais elevadas de E3, a diferença entre animais artríticos tratados e não tratados foi significativa ($p < 0,0001$).

Novamente de acordo com os estudos anteriores, os ratos tratados com E3 mostraram uma perda de peso menos evidente do que os ratos artríticos tratadas com salina (Tabela 22 e Figura 22). Na realidade, os ratos tratados com doses elevadas de anticorpo E3 estavam a recuperar a perda de peso anterior e a aumentar efetivamente de peso mais rapidamente do que os respetivos grupos não artríticos (Tabela 21 e Figura 21).

Depósito de Material Biológico

Os materiais seguintes foram depositados com a American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, EUA (ATCC):

<i>Material</i>		<u>ATCC N.º de Acesso</u>	<u>Data de Depósito</u>
Eb.911.3E	cadeia leve E3	PTA-4893	8 de janeiro de 2003
Eb.pur.911.3E	cadeia leve E3	PTA-4894	8 de janeiro de 2003
Db.911.3E	cadeia pesada E3	PTA-4895	8 de janeiro de 2003

O vetor Eb.911.3E é um polinucleótido que codifica a região variável de cadeia leve E3; o vetor Eb.pur.911.3E é um polinucleótido que codifica a região variável de cadeia leve E3, e o vetor Db.911.3E é um polinucleótido que codifica a região variável de cadeia pesada E3.

Este depósito foi criado segundo as disposições do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para Efeitos do Procedimento em Matérias de Patentes e os Regulamentos abaixo (Tratado de Budapeste). Isto assegura a manutenção de uma cultura viável do depósito durante 30 anos a partir da data de depósito. O depósito será disponibilizado pela ATCC segundo

os termos do Tratado de Budapeste e sujeito a um acordo entre Rinat Neuroscience Corp. e ATCC, o que garante a disponibilidade permanente e sem restrições da progenitura da cultura do depósito ao público na emissão da Patente U.S. pertinente ou na apresentação ao público de qualquer pedido de patente U.S. ou estrangeiro, conforme o que ocorrer primeiro, e garante a disponibilidade da progenitura a uma pessoa determinada pelo Comissário U.S. de Patentes e Marcas Registradas que será o titular da mesma de acordo com 35 USC Secção 122 e as normas do Comissário em conformidade (incluindo 37 CFR Secção 1.14 com particular referência a 886 OG 638).

O titular do presente pedido de patente aceitou que, em caso de morte, perda ou destruição de uma cultura dos materiais no depósito quando cultivada em condições adequadas, os materiais serão prontamente substituídos por outros iguais. A disponibilidade do material depositado não deve ser criada como uma licença para praticar a invenção infringindo os direitos concedidos ao abrigo da autoridade de qualquer governo de acordo com as respectivas leis de patentes.

Sequências de anticorpos

Região variável de cadeia pesada (as CDRs de Kabat estão sublinhadas; as CDRs de Chothia estão a **NEGRITO E EM ITÁLICO**)

**QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTD
 YNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWGQG
 TLVTVS (SEQ ID NO:1)**

Região variável de cadeia leve (as CDRs de Kabat estão sublinhadas; as CDRs de Chothia estão a **NEGRITO E EM ITÁLICO**)

**DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRRASQSISNNLNWYQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG
 VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRT (SEQ.ID
 NO:2)**

CDRs alargadas de cadeia pesada E3

CDRH1: GFSLIGYDLN (SEQ. ID N.º 3)

CDRH2: IIWGDGTTDYN SAVKS (SEQ. ID N.º 4)

CDRH3: GGYWYATSYFDY (SEQ. ID N.º 5)

CDRs alargadas de cadeia leve E3

CDRL1: RASQSISNNLN (SEQ. ID N.º 6)

CDRL2: YTSRFHS (SEQ. ID N.º 7)

CDRL3: QQEHTLPYT (SEQ. ID N.º 8)

CDRs alargadas de anticorpo monoclonal de ratinho 911

CDRs alargadas de cadeia pesada 911

CDRH1: GFSLIGYDIN (SEQ. ID N.º 9)

CDRH2: MIWGDGTTDYN SALKS (SEQ. ID N.º 10)

CDRH3: GGYYYGTSYFDY (SEQ. ID N.º 11)

CDRs alargadas de cadeia leve 911

CDRL1: RASQDISNHLN (SEQ. ID N.º 12)

CDRL2: YISRFHS (SEQ. ID N.º 13)

CDRL3: QQSKTLPYT (SEQ. ID N.º 14)

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada E3 (completa)

**QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWRQPPGKGLEWIGIHWGDGTT
 DYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFDYW
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKC
 CVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
 TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK(SEQ ID NO:16)**

Sequência de aminoácidos de cadeia leve 3E (anticorpo inteiro)

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG
VPSRFGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHXVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:17)**

Sequência de nucleótidos de cadeia pesada 3E (anticorpo inteiro)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGAGACCCT
GTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACTTATCGGCTATGATCTTAACTGG
ATCCGACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGGTG
ATGGAACCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCCGCGTCACCATCTCAAAGA
CACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACAC
GGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTIATTGGTACGCCACTAGCTACTACTT
TGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGG
CCCATCTGTCTTCCCCTGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCC
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCTGTGACCGTGTCTGG
AACTCTGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGAGTCC
TCAGGTCTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCATCCAGCAACTTCGGC
ACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTCGAC
AAGACCGTGGAGAGAAAAGTGTGTGTGGAGTGTCCACCTGTCCAGCCCCTCCA
GTGGCCGGACCATCCGTGTTCTGTCCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATG
ATCTCCAGAACCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGA
CCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCA
AGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTTCAGAGTGGTGGAGCGTG
CTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGT
GTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGCATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGG
ACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATAACCTGCCACCATCCAGAGAGGAGATGA
CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCGACA
TCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGAGAACA ACTATAAGACCACC
CCTCCAATGCTGGACTCCGACGGATCCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACCGTGG
ACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTTGTTCCTGTATGCACGAG
GCCCTGCACAACCACTATAACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCAGGAAAGTAA(
SEQ ID NO: 65)

Sequência de nucleótidos de domínio variável de cadeia pesada 3E

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTCCGAGACCCT
 GTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTCTCACTATCGGCTATGATCTTAACTGG
 ATCCGACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGGTG
 ATGGAACCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCCGCGTCACCATCTCAAAGA
 CACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACAC
 GGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTACTACTT
 TGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:66)

Sequência de nucleótidos de cadeia leve 3E (anticorpo inteiro)

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCGC
 GTCACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTATC
 AGCAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACCTCCTGATCTACTACACCTCACGCTTCCA
 CTCAGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTCACCTTC
 ACCATTAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAACAGGAG
 CATAACCTTCCATATACCTTCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGCACTG
 TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCGG
 AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCACGCGAGGCCAAAGT
 ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
 CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACCCTGA
 GCAAAGCAGACTACGAGAAACACMAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCTGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGCTAA(SEQ ID
 NO:67)

Sequência de nucleótidos de domínio variável de cadeia leve 3E

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCGC
GTCACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTAT
CAGCAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACCTCCTGATCTACTACACCTCACGCTT
CCTCAGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTTAC
CTTCACCATTAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAACA
GGAGCATAACCCTTCCATATACCTTCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAAC
GC(SEQ ID NO:68)

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 02096458 A [0007]
- GB 9901441 W [0013] [0256] [0271]
- GB 9809951 A [0013] [0256] [0271]
- US 5545807 A [0110]
- US 5545806 A [0110]
- US 5569825 A [0110]
- US 5625126 A [0110]
- US 5633425 A [0110]
- US 5661016 A [0110]
- US 5750373 A [0110]
- US 5500362 A [0114] [0256]
- US 5821337 A [0114]
- US 6027927 A [0147]
- US 5807715 A [0163] [0270]
- US 4816567 A [0163] [0270]
- US 6331415 A [0163]
- WO 9404690 A [0169]
- US 4676980 A [0170]
- WO 9100360 A [0170]
- WO 92200373 A [0170]
- EP 03089 A [0170]
- WO 9958572 A [0172] [0189]
- US 5047335 A [0187]
- US 5510261 A [0187]
- US 5278299 A [0187]
- US 4683195 A [0213]
- US 4800159 A [0213]

- US 4754065 A [0213]
- US 4683202 A [0213]
- WO 8704462 A [0216] [0218] [0278]
- US 6436908 B [0237] [0281]
- US 6413942 B [0237] [0281]
- US 6376471 B [0237] [0281]
- WO 9007936 A [0239] [0283]
- WO 9403622 A [0239] [0283]
- WO 9325698 A [0239] [0283]
- WO 9325234 A [0239] [0283]
- WO 9311230 A [0239] [0283]
- WO 9310218 A [0239] [0283]
- WO 9102805 A [0239] [0283]
- US 5219740 A [0239] [0283]
- US 4777127 A [0239] [0283]
- GB 2200651 A [0239] [0283]
- EP 0345242 A [0239] [0283]
- WO 9412649 A [0239] [0283]
- WO 9303769 A [0239] [0283]
- WO 9319191 A [0239] [0283]
- WO 9428938 A [0239] [0283]
- WO 9511984 A [0239] [0283]
- WO 9500655 A [0239] [0283]
- US 5814482 A [0240] [0284]
- WO 9507994 A [0240] [0284]
- WO 9617072 A [0240] [0284]
- WO 9530763 A [0240] [0284]
- WO 9742338 A [0240] [0284]
- WO 9011092 A [0240] [0284]
- US 5580859 A [0240] [0284]
- US 5422120 A [0240] [0284]
- WO 9513796 A [0240] [0284]
- WO 9423697 A [0240] [0284]
- WO 9114445 A [0240] [0284]
- NO 0524968 [0240]

- WO 0178698 A [0255]
- WO 0164247 A [0255]
- US 5844092 A [0255]
- US 5877016 A [0255]
- US 6153189 A [0255]
- US 5866692 A [0270]
- US 6331415 B [0270]
- US 5530101 A [0270]
- US 5693761 A [0270]
- US 5693762 A [0270]
- US 5585089 A [0270]
- US 6180370 B [0270]
- EP 0519596 A [0271]
- US 6180377 B [0271]
- US 6054297 B [0271]
- US 5997867 B [0271]
- US 5866692 B [0271]
- US 6210671 B [0271]
- US 6350861 B [0271]
- WO 0127160 A [0271]
- US 5565332 A [0273]
- US 5580717 A [0273]
- US 5733743 A [0273]
- US 6265150 A [0273]
- WO 9306213 A [0273]
- EP 0524968 A [0284]
- US 5766863 A [0285]
- US 5891650 A [0285]
- WO 0053211 A [0291]
- US 5981568 A [0291]
- US 4485045 A [0301]
- US 4544545 A [0301]
- US 5013556 A [0301]
- US 3773919 A [0303]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **SMEYNE et al.** *Nature*, 1994, vol. 368, 246-249 [0002]
[0003]
- **CROWLEY et al.** *Cell*, 1994, vol. 76, 1001-1011 [0002]
[0003]
- **LINDSAY ; HARMER.** *Nature*, 1989, vol. 337, 362-364
[0002]
- **CHAO et al.** *Science*, 1986, vol. 232, 518-521 [0002]
[0003]
- **HUANG et al.** *Annu. Rev. Neurosci.*, 2001, vol. 24, 677-
736 [0002]
- **BIBEL et al.** *Genes Dev.*, 2000, vol. 14, 2919-2937
[0002]
- *Nature*, 1991, vol. 254, 411 [0002]
- *Nature*, 1996, vol. 401, 184-188 [0002]
- **LINDSAY et al.** *Nature*, 1989, vol. 337, 362-364 [0003]
- **OTTEN et al.** *Eur J Pharmacol.*, 1984, vol. 106, 199-201
[0004]
- **OTTEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86,
10059-10063 [0004]
- **MATSUDA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol.
85, 6508-6512 [0004]
- **PEARCE et al.** *J. Physiol.*, 1986, vol. 372, 379-393
[0004]
- **BISCHOFF et al.** *Blood*, 1992, vol. 79, 2662-2669 [0004]
- **HORIGOME et al.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 14881-
14887 [0004]
- **TORCIA et al.** *Cell*, 1996, vol. 85 (3), 345-56 [0004]
- **LEON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91,
3739-3743 [0005]
- **TORCIA et al.** *Cell*, 1996, vol. 85, 345-356 [0005]
- **DI MARCO et al.** *J. Biol. Chem.*, vol. 268, 22838-22846
[0005]

- **UEYAMA et al.** *J. Hypertens*, 1993, vol. 11, 1061-1065 [0005]
- **LINDHOLM et al.** *Eur. J. Neurosci.*, 1990, vol. 2, 795-801 [0005]
- **KASSEL et al.** *Clin. Exp. Allergy*, 2001, vol. 31, 1432-40 [0005]
- **STEINER et al.** *Am. J. Physiol.*, 1991, vol. 261, F792-798 [0005]
- **SCHWARTZ et al.** *J Photochem. Photobiol.*, 2002, vol. B66, 195-200 [0005]
- **BRACCI-LAUDIERO et al.** *Neuroreport*, 1993, vol. 4, 563-565 [0006]
- **BRACCI-LAUDIERO et al.** *Neurosci. Lett.*, 1992, vol. 147, 9-12 [0006]
- **RAYCHAUDHURI et al.** *Acta Derm. l'enereol.*, 1998, vol. 78, 84-86 [0006]
- **FALCIM et al.** *Ann. Rheum. Dis.*, 1996, vol. 55, 745-748 [0006]
- **OKRAGLY et al.** *J. Urology*, 1999, vol. 161, 438-441 [0006]
- **BRAUN et al.** *Eur. J Immunol.*, 1998, vol. 28, 3240-3251 [0006]
- **ALOE et al.** *Arch. Rheum.*, 1992, vol. 35, 351-355 [0007]
- **ALOE et al.** *Clin. Exp. Rheumatol.*, 1992, vol. 10, 203-204 [0007]
- **ALOE.** *Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects*, 1993, vol. 15, 139-143 [0007]
- **ALOE et al.** *Rheumatol. Int.*, 1995, vol. 14, 249-252 [0007]
- **MANNI et al.** *Rheumatol. Int.*, 1998, vol. 18, 97-102 [0007]
- **IANNONE et al.** *Rheumatology*, 2002, vol. 41, 1413-1418 [0008]
- **HONGO et al.** *Hybridoma*, 2000, vol. 19 (3), 215-227 [0009] [0340] [0395]

- **RUBERTI et al.** *Cell. Molec. Neurobiol.*, 1993, vol. 13 (5), 559-568 [0009]
- *Eur. J. Immunol.*, 1999, vol. 29, 2613-2624 [0013] [0256] [0388]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0105]
- *Oligonucleotide Synthesis*. 1984 [0105]
- *Methods in Molecular Biology*. Humana Press [0105]
- *Cell Biology: A Laboratory Notebook*. Academic Press, 1998 [0105]
- *Animal Cell Culture*. 1987 [0105]
- **J.P. MATHER ; P.E. ROBERTS**. *Introduction to Cell and Tissue Culture*. Plenum Press, 1998 [0105]
- *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. J. Wiley and Sons, 1993 [0105]
- *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc, [0105]
- *Handbook of Experimental Immunology* [0105]
- *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*. 1987 [0105]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. 1987 [0105]
- *PCR: The Polymerase Chain Reaction*. 1994 [0105]
- *Current Protocols in Immunology*. 1991 [0105]
- *Short Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Sons, 1999 [0105]
- **C.A. JANEWAY ; P. TRAVERS**. *Immunobiology*, 1997 [0105]
- **P. FINCH**. *Antibodies*, 1997 [0105]
- *Antibodies: a practical approach*. IRL Press, 1988 [0105]
- *Monoclonal antibodies: a practical approach*. Oxford University Press, 2000 [0105]
- *Using antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0105]
- *The Antibodies*. Harwood Academic Publishers, 1995 [0105]
- *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. J.B. Lippincott Company, 1993 [0105]

- **VAUGHAN et al.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 309-314 [0110]
- **SHEETS et al.** *PNAS*, 1998, vol. 95, 6157-6162 [0110]
- **HOOGENBOOM ; WINTER.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0110]
- **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0110]
- **COLE et al.** *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy.* Alan R. Liss, 1985, 77 [0110]
- **BOERNER et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0110]
- **CLYNES et al.** *PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 652-656 [0114]
- **RAVETCH ; KINET.** *Ann. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-92 [0115]
- **CAPEL et al.** *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0115]
- **DE HAAS et al.** *J. Lab. Clin. Med*, 1995, vol. 126, 330-41 [0115]
- **GUYER et al.** *J. Immunol.*, 1976, vol. 117, 587 [0115]
- **KIM et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 249 [0115]
- **GAZZANO-SANTORO et al.** *J. Immunol. Methods*, 1996, vol. 202, 163 [0116]
- **KABAT et al.** *Sequences of Proteins of Immunological Interest.* National Institutes of Health, 1991 [0122]
- **CHOTHIA et al.** *Nature*, 1989, vol. 342, 877 [0122]
- **AL-LAZIKANI et al.** *J. Molec. Biol.*, 1997, vol. 273, 927-948 [0122]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences.* Mack Publishing Co, 1990 [0142]
- *Remington, The Science and Practice of Pharmacy.* Mack Publishing, 2000 [0142] [0230]
- **PONS et al.** *Prot. Sci.*, 1999, vol. 8, 958-968 [0159]
- **PEETERS et al.** *Vaccine*, 2001, vol. 19, 2756 [0164] [0275]
- **LONBERG, N. ; D. HUSZAR.** *Int.Rev.Immunol*, 1995, vol. 13, 65 [0164] [0275]

- **POLLOCK et al.** *J Immunol Methods*, 1999, vol. 231, 147
[0164] [0275]
- **BIRD et al.** *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0165]
- **HOLLIGER, P. et al.** *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1993,
vol. 90, 6444-6448 [0166]
- **POLJAK, R. J. et al.** *Structure*, 1994, vol. 2, 1121-1123
[0166]
- **SURESH et al.** *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121,
210 [0167]
- **MILLSTEIN ; CUELLO.** *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539
[0167]
- **CUNNINGHAM ; WELLS.** *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085
[0176]
- **JEFFERIS ; LUND.** *Chem. Immunol.*, 1997, vol. 65, 111-128
[0183]
- **WRIGHT ; MORRISON.** *TibTECH*, 1997, vol. 15, 26-32 [0183]
- **BOYD et al.** *Mol. Immunol.*, 1996, vol. 32, 1311-1318
[0183]
- **WITTWE ; HOWARD.** *Biochem.*, 1990, vol. 29, 4175-4180
[0183]
- **WYSS ; WAGNER.** *Current Opin. Biotech.*, 1996, vol. 7,
409-416 [0183]
- **UMANA et al.** *Mature Biotech.*, 1999, vol. 17, 176-180
[0183]
- **HSE et al.** *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 9062-9070
[0186]
- A model of evolutionary change in proteins - Matrices
for detecting distant relationships. **DAYHOFF, M.O.**
Atlas of Protein Sequence and Structure. National
Biomedical Research Foundation, 1978, vol. 5, 345-358
[0205]
- Unified Approach to Alignment and Phylogenesis. **HEIN J.**
Methods in Enzymology. Academic Press, Inc, 1990, vol.
183, 626-645 [0205]

- **HIGGINS, D.G. ; SHARP, P.M.** *CABIOS*, 1989, vol. 5, 151-153 [0205]
- **MYERS, E.W. ; MULLER W.** *CABIOS*, 1988, vol. 4, 11-17 [0205]
- **ROBINSON, E.D.** *Comb. Theor.*, 1971, vol. 11, 105 [0205]
- **SANTOU, N. ; NES, M.** *Mol. Biol. Evol.*, 1987, vol. 4, 406-425 [0205]
- **SNEATH, P.H.A. ; SOKAL, R.R.** *Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy*. Freeman Press, 1973 [0205]
- **WILBUR, W.J. ; LIPMAN, D.J.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 726-730 [0205]
- **PCR: The Polymerase Chain Reaction**. Birkauser Press, 1994 [0213]
- **ZOLA.** *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*. CRC Press, Inc, 1987, 147-158 [0225]
- **MAHATO et al.** *Pharm. Res.*, 1997, vol. 14, 853-859 [0235]
- **FINDEIS et al.** *Trends Biotechnol.*, 1993, vol. 11, 202 [0238] [0282]
- **CHIOU et al.** *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer*. 1994 [0238]
- **WU et al.** *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 621 [0238] [0282]
- **WU et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 542 [0238] [0282]
- **ZENKE et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1990, vol. 87, 3655 [0238]
- **WU et al.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 338 [0238] [0282]
- **JOLLY.** *Cancer Gene Therapy*, 1994, vol. 1, 51 [0238] [0282]
- **KIMURA.** *Human Gene Therapy*, 1994, vol. 5, 845 [0238] [0282]

- **CONNELLY.** *Human Gene Therapy*, 1995, vol. 1, 185 [0238]
[0282]
- **KAPLITT.** *Nature Genetics*, 1994, vol. 6, 148 [0238]
[0282]
- **CURIEL.** *Hum. Gene Ther.*, 1992, vol. 3, 147 [0239]
[0240] [0283] [0284]
- **WU.** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 16985 [0240] [0284]
- **PHILIP.** *Mol. Cell Biol.*, 1994, vol. 14, 2411 [0240]
[0284]
- **WOFFENDIN.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, vol. 91, 1581
[0240]
- **ROUBENOFF et al.** *Arthritis Rheum.*, 1997, vol. 40 (3),
534-9 [0244]
- **ROUBENOFF et al.** *J. Clin. Invest.*, 1994, vol. 93 (6),
2379-86 [0244]
- **KATZ et al.** *Surg Clin North Am.*, 1999, vol. 79 (2),
231-52 [0245] [0250]
- **CARACENI et al.** *J Pain Symptom Manage*, 2002, vol. 23
(3), 239-55 [0245] [0250]
- **FELSON et al.** *Arthritis and Rheumatism*, 1993, vol. 36
(6), 729-740 [0245]
- **FRIES et al.** *J. Rheumatol.*, 1982, vol. 9, 789-793
[0245]
- **PAULUS et al.** *Arthritis and Rheumatism*, 1990, vol. 33,
477-484 [0245]
- **MEENAM et al.** *Arthritis and Rheumatology*, 1982, vol.
25, 1048-1053 [0245]
- **HONGO et al.** *Hybridoma*, 2000, vol. 19, 215-227 [0255]
[0256] [0262] [0280] [0289]
- *Cell. Molec. Biol.*, 1993, vol. 13, 559-568 [0255]
- **KARLSSON, R. ROOS ; H. FAGERSTAM ; L. PE-TERSSON, B.**
Methods Enzymology, 1994, vol. 6, 99-110 [0260]
- **KOHLER, B. ; MILSTEIN, C.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-
497 [0266]

- **BUCK, D. W. et al.** *In Vitro*, 1982, vol. 18, 377-381 [0266]
- **WINTER et al.** *Nature*, 1991, vol. 349, 293-299 [0271]
- **LOBUGLIO et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 4220-4224 [0271]
- **SHAW et al.** *J Immunol.*, 1987, vol. 138, 4534-4538 [0271]
- **BROWN et al.** *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, 3577-3583 [0271]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0271]
- **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0271]
- **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0271]
- **DAUGHERTY et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1991, vol. 19, 2471-2476 [0271]
- **WINTER et al.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1994, vol. 12, 433-455 [0273]
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-553 [0273]
- **JOHNSON, KEVIN S. ; CHISWELL, DAVID J.** *Current Opinion in Structural Biology*, 1993, vol. 3, 564-571 [0273]
- **CLACKSON et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0273]
- **MARK et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0273]
- **GRIFFITH et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0273]
- **MARKS et al.** *Bio/Technol.*, 1992, vol. 10, 779-783 [0273]
- **WATERHOUSE et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0273]
- **MORRISON et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1984, vol. 81, 6851 [0278]
- **HARLOW ; LANE.** *Using Antibodies, a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0279]
- **CHIOU et al.** *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer.* 1994 [0282]

- **ZENKE et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 3655 [0282]
- **WOFFENDIN.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, vol. 91, 1581 [0284]
- **GREENE et al.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1976, vol. 73 (7), 2424-8 [0288]
- **LEVI-MONTALCINI, R. ; ANGELETTI, P.** Nerve growth factor. *Physiol. Rev.*, 1968, vol. 48, 534-569 [0288]
- **CHUN ; PATTERSON.** *Dev. Biol.*, 1977, vol. 75, 705-711 [0288]
- **BUCHMAN ; DAVIES.** *Development*, 1993, vol. 118, 989-1001 [0288]
- **REMINGTON.** *The Science and Practice of Pharmacy.* Mack Publishing, 2000 [0292] [0300] [0302]
- **EPSTEIN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0301]
- **HWANG et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0301]
- **BALINT et al.** *Gene*, 1993, vol. 137 (1), 109-18 [0318] [0333] [0345]
- **KAY et al.** *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual.* Academic Press, 1996, 277-291 [0333]
- **INNIS et al.** *PCR protocols: A guide to methods and applications*, 1990, 177-183 [0333]
- **KARLSSON, R. ; ROOS, H. ; FAGERSTAM, L. ; PETERSSON, B.** *Methods Enzymology*, 1994, vol. 6, 99-110 [0339]
- **PRODROMOU et al.** *Protein Eng*, 1992, vol. 5 (8), 827-9 [0342]
- **BARBAS.** *Phage display: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0342]
- **INNIS et al.** *PCR strategies.* Academic Press, 1995 [0344]
- **AL-LAZIKANI et al.** *J. Mol. Biol.*, 1997, vol. 273 (4), 927-48 [0345]

- **KAY et al.** Phage display of peptides and proteins : a laboratory manual. Academic Press, 1996 [0345]
- **KAY et al.** Phage display of Peptides and Proteins: a laboratory manual. Academic Press, 1996 [0353]
- *Eur. J. Immunol.*, 1990, vol. 29, 2613-2624 [0384]
- **BRENNAN et al.** *Pain*, 1996, vol. 64, 493-501 [0390]
- **KUZUNA et al.** *Chem. Pharm. Bull.*, 1975, vol. 23, 1184-1191 [0397]
- **PEARSON et al.** *Arthritis Rheum.*, 1959, vol. 2, 440-459 [0397]

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo antifator de crescimento do nervo (NGF) ou fragmento do mesmo, caracterizado por compreender:

(a) três CDRs de uma região variável de cadeia pesada de SEQ. ID N.º 1; e

(b) três CDRs de uma região variável de cadeia leve de SEQ. ID N.º 2;

em que as CDRs são CDRs de Kabat, CDRs de Chothia ou uma combinação de CDRs de Kabat e de Chothia, em que o anticorpo ou fragmento do mesmo liga o NGF humano com uma K_D de 2nM ou menos conforme determinado pela ressonância de plasma de superfície BIAcore.

2. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o anticorpo compreender uma região variável de cadeia pesada que compreende:

(a) uma região CDR1 ilustrada na SEQ. ID N.º 3;

(b) uma região CDR2 ilustrada na SEQ. ID N.º 4; e

(c) uma região CDR3 ilustrada na SEQ. ID N.º 5.

3. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por o anticorpo compreender uma região variável de cadeia leve que compreende:

(a) uma região CDR1 ilustrada na SEQ. ID N.º 6;

(b) uma região CDR2 ilustrada na SEQ. ID N.º 7; e

(c) uma região CDR3 ilustrada na SEQ. ID N.º 8.

4. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações, caracterizado por o anticorpo ou fragmento do mesmo compreender ainda uma região constante de cadeia pesada IgG2a humana.

5. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o anticorpo ou fragmento do mesmo compreender ainda uma região constante de cadeia leve kappa humana.

6. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado por a região constante de cadeia pesada IgG2a humana ser modificada.

7. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a região constante de cadeia pesada IgG2a humana compreender as mutações A330P331 a S330S331, numeração de aminoácidos relativamente à sequência de IgG2a de tipo selvagem.

8. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo caracterizado por compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de SEQ. ID N.º 1; e

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de SEQ. ID N.º 2.

9. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o anticorpo compreender:

(a) uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ. ID N.º 16; e

(b) uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ. ID N.º 17.

10. Um anticorpo antifator de crescimento do nervo (NGF) ou fragmento do mesmo, caracterizado por compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada que compreende:

(i) uma região CDR1 de SEQ. ID N.º 3;

(ii) uma região CDR2 de SEQ. ID N.º 4;
(iii) uma região CDR3 selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ. ID N.ºs 58 e 60; e
(b) uma região variável de cadeia leve que compreende:
(i) uma região CDR1 de SEQ. ID N.º 6;
(ii) uma região CDR2 de SEQ. ID N.º 7;
(iii) uma região CDR3 selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ. ID N.ºs 57, 59 e 61;
em que o anticorpo ou fragmento do mesmo liga o NGF humano com uma K_D de 2nM ou menos conforme determinado pela ressonância de plasma de superfície BIAcore.

11. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por o anticorpo ou fragmento do mesmo compreender ainda uma região constante de cadeia pesada IgG2a humana.

12. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o anticorpo ou fragmento do mesmo compreender ainda uma região constante de cadeia leve kappa humana.

13. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado por a região constante de cadeia pesada IgG2a humana ser modificada.

14. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a região constante de cadeia pesada IgG2a humana compreender as mutações A330P331 a S330S331, numeração de aminoácidos relativamente à sequência de IgG2a de tipo selvagem.

15. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações,

caracterizado por o anticorpo ou fragmento do mesmo ligar ainda o NGF de roedor.

16. Uma composição farmacêutica caracterizada por compreender (a) um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações, e (b) um excipiente farmacêuticamente aceitável.

17. Um kit caracterizado por compreender o anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15.

18. Um método de criação do anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, em que o referido método compreende a expressão de um polinucleótido que codifica o anticorpo ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 numa célula hospedeira não humana *in vitro*.

19. Um polinucleótido isolado caracterizado por compreender uma sequência de nucleótidos que codifica um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15.

20. O polinucleótido de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o polinucleótido compreender a sequência de nucleótidos ilustrada na SEQ. ID N.º 65.

21. O polinucleótido de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o polinucleótido compreender a sequência de nucleótidos ilustrada na SEQ. ID N.º 66.

22. O polinucleótido de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o polinucleótido compreender a sequência de nucleótidos ilustrada na SEQ. ID N.º 67.

23. O polinucleótido de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o polinucleótido compreender a sequência de nucleótidos ilustrada na SEQ. ID N.º 68.

24. O polinucleótido de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o polinucleótido compreender a sequência de nucleótidos ilustrada na SEQ. ID N.º 66 e a sequência de nucleótidos ilustrada na SEQ. ID N.º 68.

25. Um vetor caracterizado por compreender um polinucleótido que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15.

26. Uma célula hospedeira isolada caracterizada por compreender um polinucleótido que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15.

27. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, para utilização no tratamento da dor.

28. Um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por o anticorpo ou fragmento do mesmo compreender as sequências de aminoácidos conforme ilustrado nas SEQ. ID N.ºs 1 e 2.

29. Utilização de um anticorpo anti-NGF ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada por ser utilizada no fabrico de um medicamento para o tratamento da dor.

30. Utilização de acordo com a reivindicação 29,

caracterizada por o anticorpo ou fragmento do mesmo compreender as sequências de aminoácidos conforme ilustrado nas SEQ. ID N.ºs 1 e 2.

FIGURA 1A - 1B
CDRs: **negrito** itálico =Kabat sublinhado=Chotia

1A) REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA

- 1=anticorpo 911 de ratinho (CDRs)
- 2=linha germinal humana de acitador
- 3=anexetado com CDR
- 4=2ªuma mutação de estrutura
- 5=4 + maturação de afinidade H1, H2
- 6=5 + maturação de afinidade H3 (região variável de cadeia pesada de anticorpo 3E)

H1

1	5	10	15	20	25	30	35	40	45
1.	V	L	Q	E	S	G	P	G	L
2-Q	V	L	Q	E	S	G	P	G	L
3-Q	V	L	Q	E	S	G	P	G	L
4-Q	V	L	Q	E	S	G	P	G	L
5-Q	V	L	Q	E	S	G	P	G	L
6-Q	V	L	Q	E	S	G	P	G	L

H2

1.	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
1.	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K
2-W	I	G	Y	I	Y	S	G	T	N	Y	N	S	A	L	K
3-W	I	G	Y	I	Y	S	G	T	N	Y	N	S	A	L	K
4-W	I	G	Y	I	Y	S	G	T	N	Y	N	S	A	L	K
5-W	I	G	Y	I	Y	S	G	T	N	Y	N	S	A	L	K
6-W	I	G	Y	I	Y	S	G	T	N	Y	N	S	A	L	K

FIGURA 1A - 1B (CONT.)

```

      95      100      105      110      115      120
      E3
1-   S E Y Y Y G T S Y Y F D Y
2- Y Y C A R G
3- Y Y C A R G G Y Y Y G T S Y Y F D Y M Q G T L V T V S
4- Y Y C A R G G Y Y Y G T S Y Y F D Y M Q G T L V T V S
5- Y Y C A R G G Y Y Y G T S Y Y F D Y M Q G T L V T V S
6- Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y M Q G T L V T V S
    
```

1B) REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA LEVE

- 1=anticorpo 911 de ratinho (CDRs)
- 2=88 linha germinal humana de aceitador
- 3=enxertado com CDR
- 4=3 + maturação de afinidade L1, L2
- 5=4 + maturação de afinidade L3 (região variável de cadeia leve de anticorpo 3E)

```

      1      5      10      15      20      25      30      35      40      45
      L1
1-   I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I S N H L M Y Q Q K P G K A P K L
2- D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I S N H L M Y Q Q K P G K A P K L
3- D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I S N H L M Y Q Q K P G K A P K L
4- D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N N L M Y Q Q K P G K A P K L
5- D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N N L M Y Q Q K P G K A P K L

      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95
      L2
1-   Y I S R F H S
2- L I Y D A S N L E T Q V P S R F S G S G S G T D F T T I E S S L Q P P E D I A T Y Y C Q Q Y D
3- L I Y I S R F H S G V P S R F S G S G S G T D F T T I S S L Q P P E D I A T Y Y C Q Q S K
4- L I Y I S R F H S G V P S R F S G S G S G T D F T T I S S L Q P P E D I A T Y Y C Q Q S K
5- L I Y I S R F H S G V P S R F S G S G S G T D F T T I S S L Q P P E D I A T Y Y C Q Q E H

      95      100      105      110      115      120
      L3
1-   Q Q S K
2- Q Q Y D
3- Q Q S K
4- Q Q S K
5- Q Q E H
    
```

FIGURA 1A - 1B (CONT.)

	95	100	105	109
1-T	L			
2-N	L			
3-T	L	Y	T	F
4-T	L	F	Y	T
5-T	L	F	Y	T

 G Q G T K L E I K R T
 F G Q G T K L E I K R T
 F G Q G T K L E I K R T
 F G Q G T K L E I K R T

Figura 2

Db.911.3E padrão: ADN circular; **1429 BP.**
 Este ficheiro é criado pelo Vator NTI
<http://www.informaxinc.com/>
VNFDATE|265871584|
VNFDATE|265873257|
VNFUTBORNAM|Utilizador Demo|
 Sequência|1429 BP; 331 A; 440 C; 380 G; 278 T;

atggccaccg	actccagAAC	ctcctggctg	ctgacagtgt	ccctgctgtg	tctgctgtgg	60
ccacaggagg	ccagggctca	ggtgcagctg	caggagtctg	gcccaggact	ggtgaagcct	120
tccgagaacc	tgtccctcac	ctgcaactgc	tctgggtctc	caattatcgg	ctatgatctt	180
aaotggatcc	gacagcctcc	agggaaagga	ctggagtggg	ttgggattat	ctggggtyat	240
ggaaccacag	actataattc	agctgtcaaa	tcccgcgtca	ccatctcaaa	agacacctcc	300
aagaaccagt	tctccctgaa	gctgagctct	gtgacccact	gtgacccact	cggtctattc	360
tgtgcagag	gaggttattg	gtacgccact	agctactact	ttgactactg	gggocagggc	420
accctggtoa	cgtctctctc	agcctccacc	aagggcccat	ctgtctctcc	actggcccca	480
tgtctccgca	gcacctccga	gagcacagcc	gcccctggct	gcttggtoaa	ggactacttc	540
ccagaacctg	tgaccctgtc	ctggaaactc	ggcgctctga	ccagggcgtt	gcacaccttc	600
ccagctgtcc	tgagctctc	aggtctctac	tccctcagca	gngtggtagc	cgtgcctacc	660
agcaacttcg	gcaccacagc	ctacacctgc	aacctagatc	acaagcccaq	caacaccsaq	720
gtccacaaga	ccgtggagag	aaagtgttgt	gtggagtgtc	caacttctcc	agccctcca	780
gtggccggac	catccctggt	cctgttccct	ccaaagccaa	aggaccctct	gatgatctcc	840
agaaccaccg	aggtgacctg	tgtgggtgtg	gacctgtccc	acgaggacc	agaggtgcag	900
tccaactcgt	atgtggacgg	agtggaggtg	caaaagccca	agaccagccc	agagagggag	960
cagttcaact	ccaccttcag	agtggtagcc	gtgctgaccg	tggtagccca	ggactggatg	1020
aacggaaagg	agtataagtg	taaggtgtcc	aaacagggac	tgccatccag	catcgagaaq	1080
accctctcca	agaccaaagg	acagccaaqa	gagccacagq	tgtataccct	gcccaccatcc	1140
agagaggaga	tgaccaaaga	ccaggtgtcc	ctyacctgtc	tggtagaagg	attctatcca	1200
tccgacatcg	ccgtggagtg	ggcgcccaac	ggacagccag	agaacaacta	taagaccacc	1260
cctccaatgc	tgactccoga	ggatcccttc	ttcctgtatt	ccaagctgac	cgtggacaag	1320
tccagatggc	agcagggaaa	cgtctctctc	tgctccgtga	tgcaagaggc	cctgcaccaac	1380
ccctataccc	agaagagcct	gtccctgtct	ccaggsaagt	aattctaga		1420

Figura 3

Eb.911.3E padrão; ADN circular; ; 729 BP.

Este ficheiro é criado pelo Vector NTI

<http://www.informaxinc.com/>

VNTDATE|285871514|

VNTDATE|285872959|

VNTAUTHORNAME|Utilizador Demo|

Sequência 729 BP; 182 A; 231 C; 161 G; 154 T; 1 outro;

atggccaccg	actccagaad	ctctgggtg	ctgacagtgt	ccctgctgtg	tctgctgtgg	60
ccacaggagg	ccagcgtga	tatccagatg	acacagtccc	catcctccct	gtctgacctt	120
gtgggtgacc	gcgtcaccat	ccctgcccgc	gcctctcagt	ccattagcaa	tactctgaac	180
tggtatcagc	agaagcccag	caaagcccca	aaactcctga	tctactaac	ctcaccgttc	240
cactcaggtg	tcccatacag	cttcagtggc	agtggctctg	gtacagattt	cacctccacc	300
attagcagcc	tgcaccaga	agatattgnc	acttattact	gcaaccagga	gcctaccctt	360
ccatatacct	tgggtcaag	caccaagctg	gagatcaaac	gcactgtggc	tgcaccctct	420
gtcttcatct	ttcctccatc	tgatgagcag	ttgaatccg	gcaatgcttc	tgttgtgtgc	480
ctgctgaata	acttetatcc	acgcgaggcc	aaagtacagt	ggaaggtgga	taaccacctc	540
caatccggta	actccagga	gagtgtcaca	gagcaggaca	gcaaggacag	caactacagc	600
ctcagcagca	ccctgacct	gagcaagcca	gactacgaga	aacacaaagt	ctacgcttgc	660
gaagtcaccc	atcagggcct	gagttctcca	gtcaacaaga	gcttcaaccg	cggtgagtgc	720
taattctag						729

Figura 4

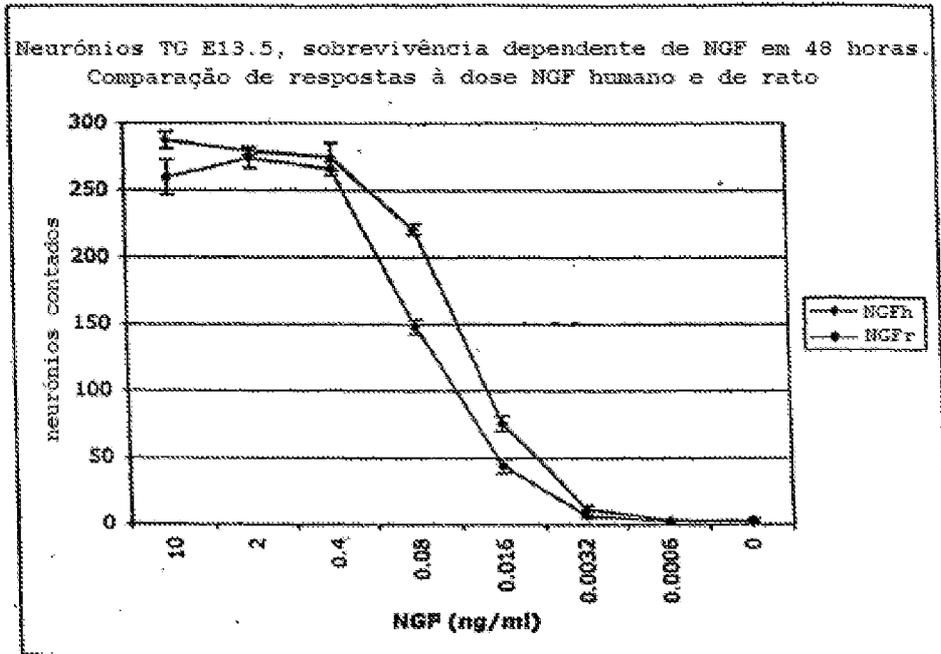


Figura 5

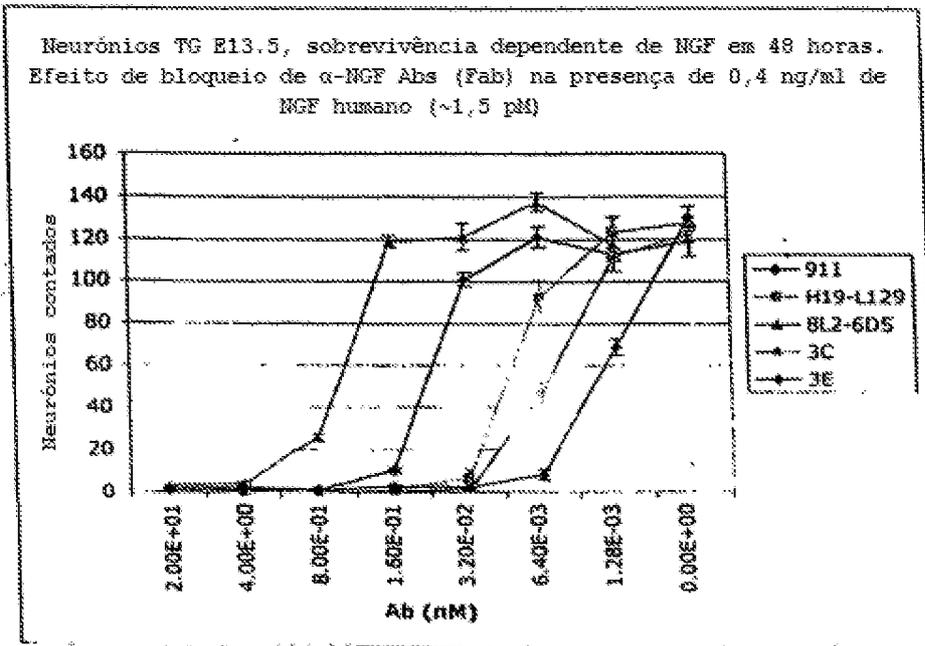
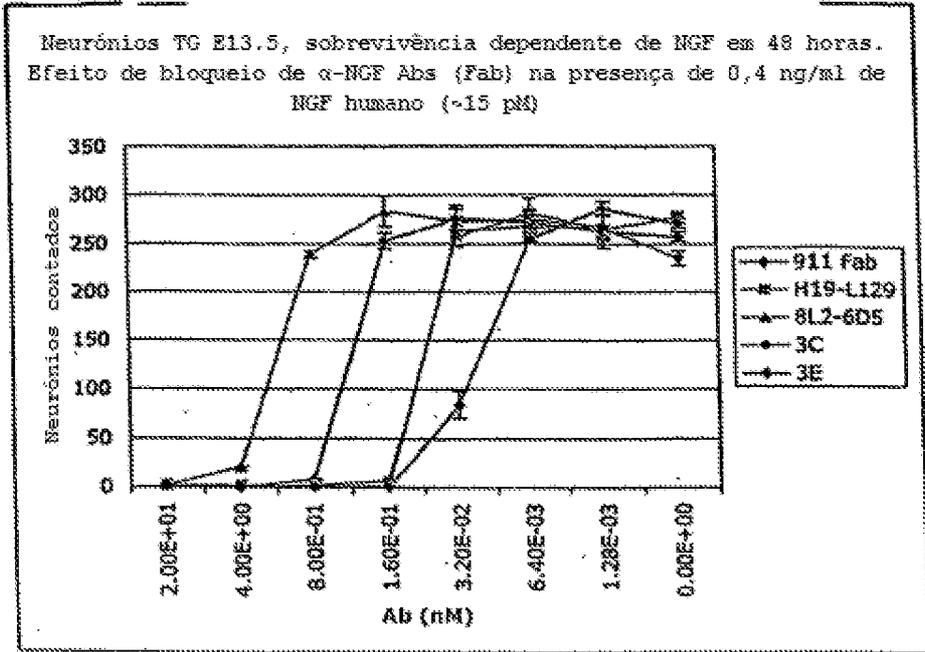
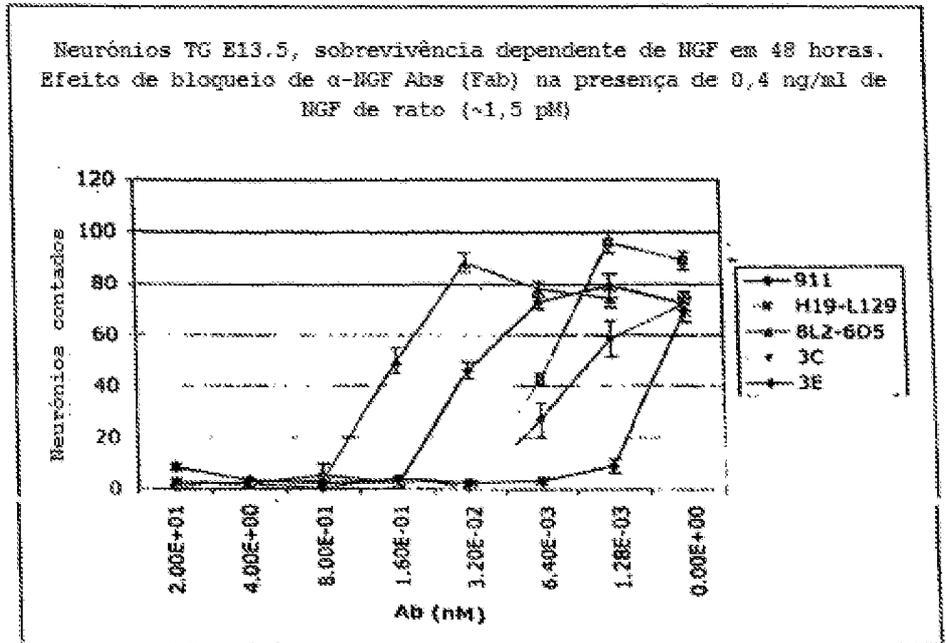
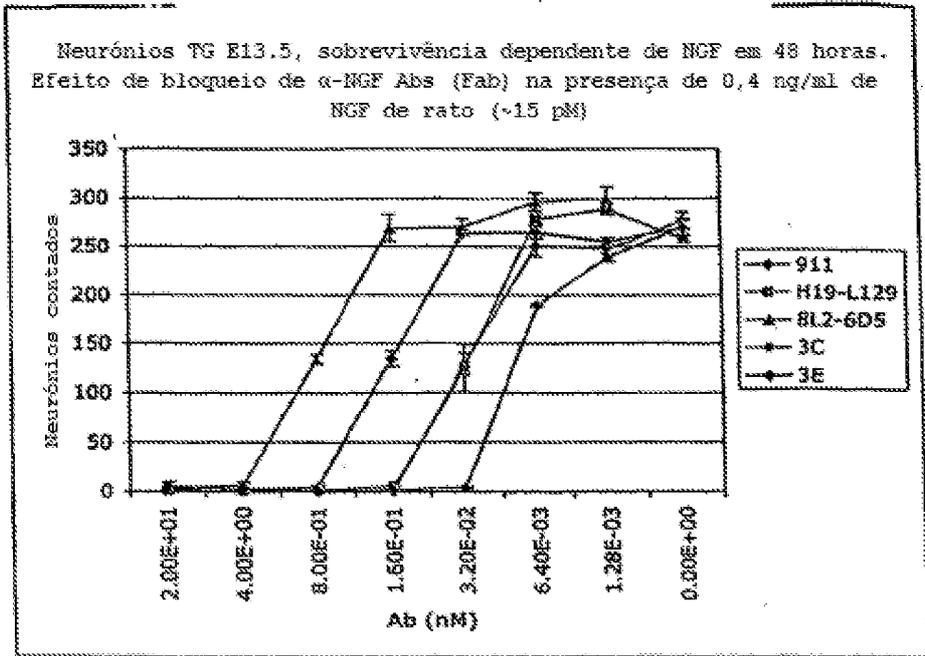


Figura 6



O anticorpo E3 anti-NGF humanizado melhora a dor pós-cirúrgica

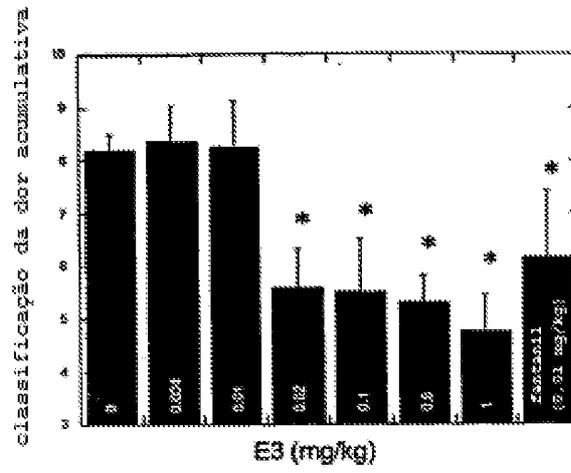


FIGURA 7

O anticorpo E3 anti-NGF mitiga a dor quando injetado duas horas após a cirurgia

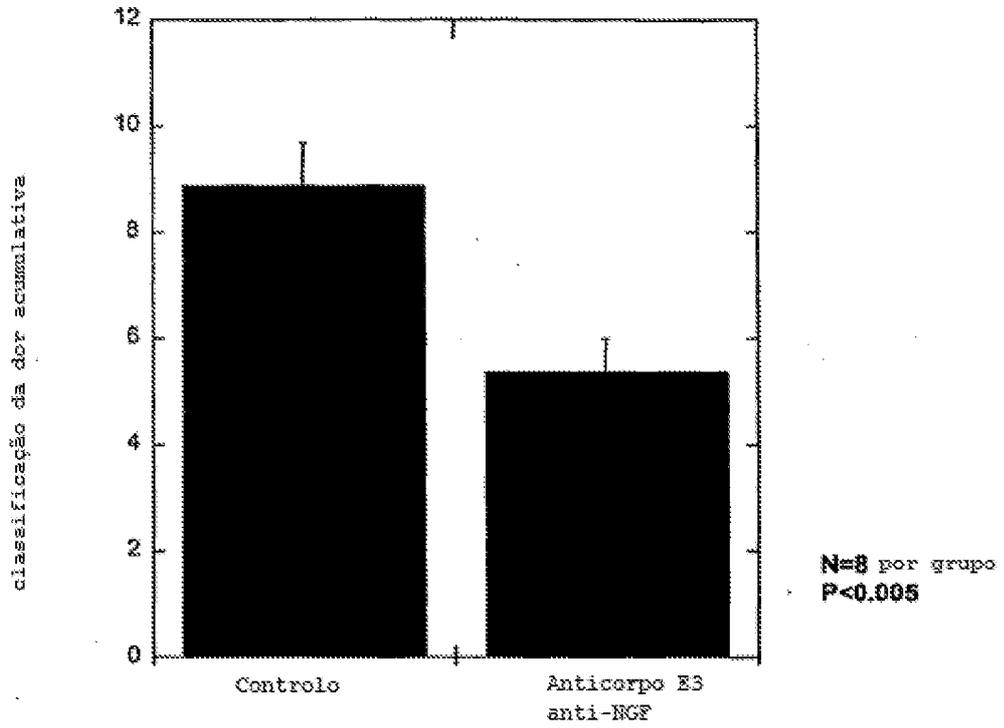


Figura 8

FIGURA 9

Cinética de ligação: 911 Fab no chip CM5 NGF

k_{on} $2.2 \cdot 10^4$ (1/Ms)
 k_{off} $8.4 \cdot 10^{-5}$ (1/s)
 K_D 3.7 nM

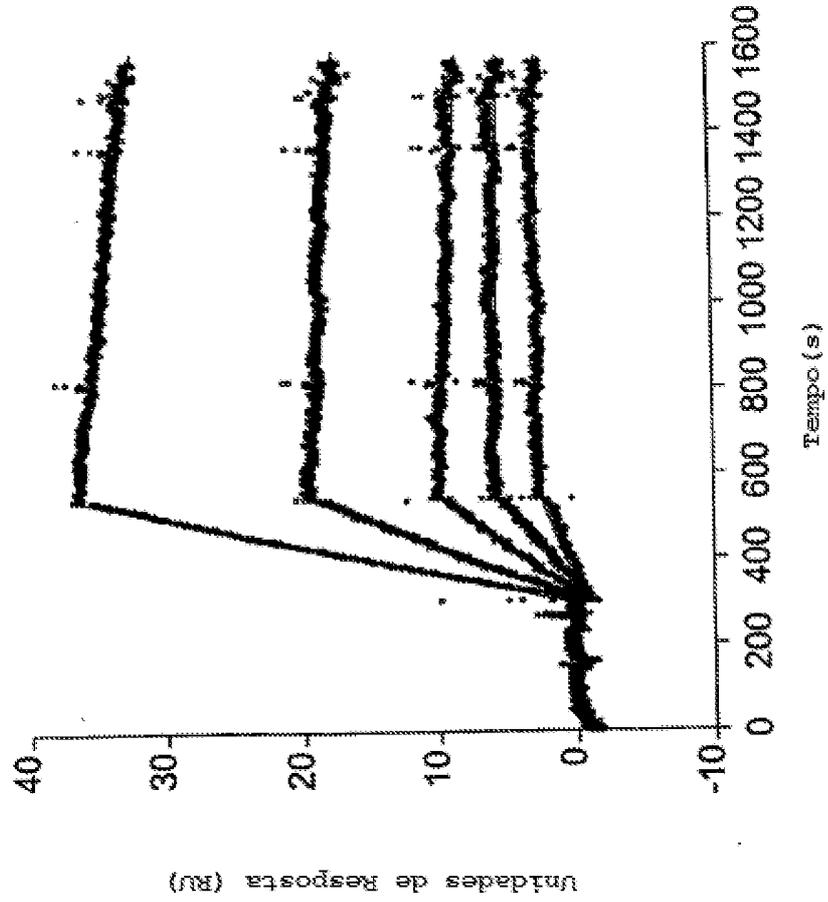


FIGURA 10

Cinética de ligação: 3E Fab no chip MME NGF

k_{on} $6.0 \cdot 10^5$ (1/Ms)
 k_{off} $4.2 \cdot 10^{-5}$ (1/s)
 K_D 0.07 nM

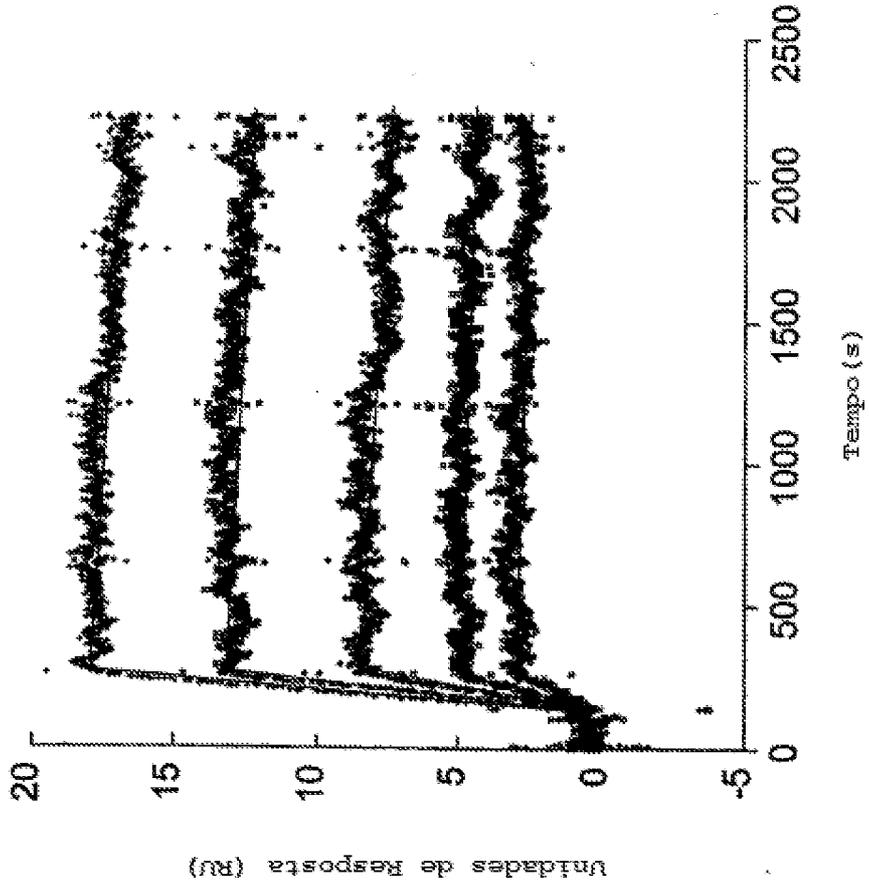
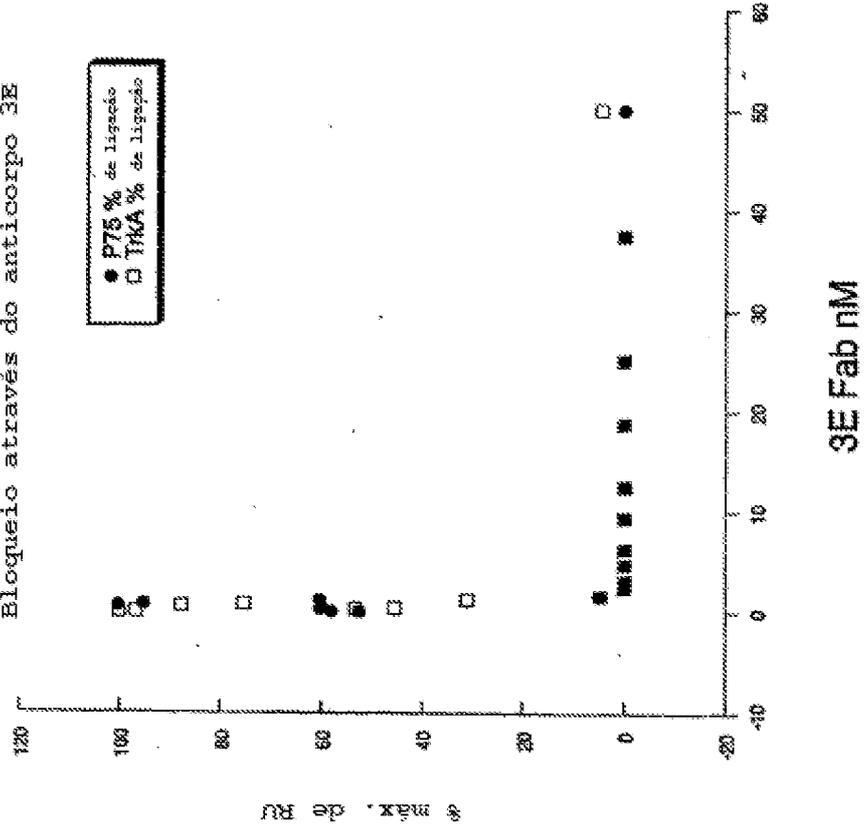


FIGURA 11

Interação de NGF-Tirka e NGF-P75:
Bloqueio através do anticorpo 3E



Comparação de 3E completo vs culturas de TC E13.5, 3E Fab, 48 horas. Inibição da sobrevivência dependente de NCF através de 3E, NCF em 0,4 ng/ml (saturação)

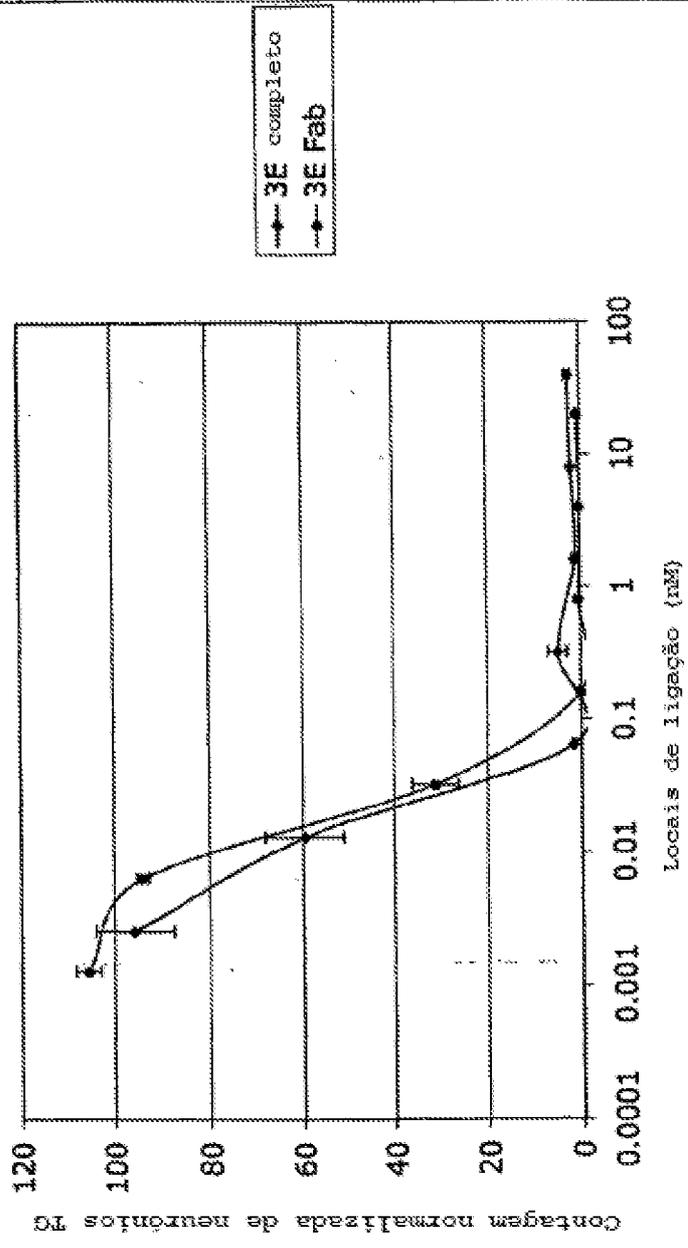


FIGURA 12

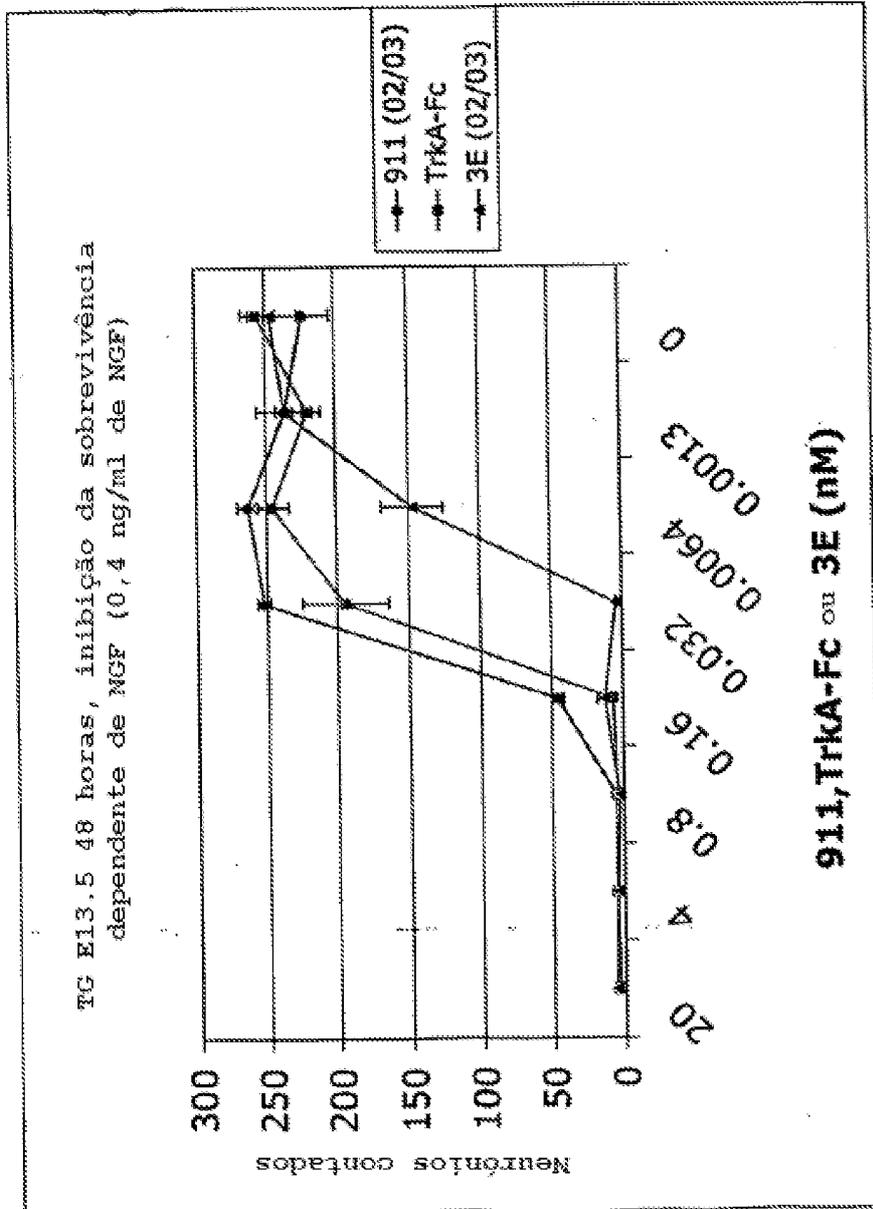


FIGURA 13

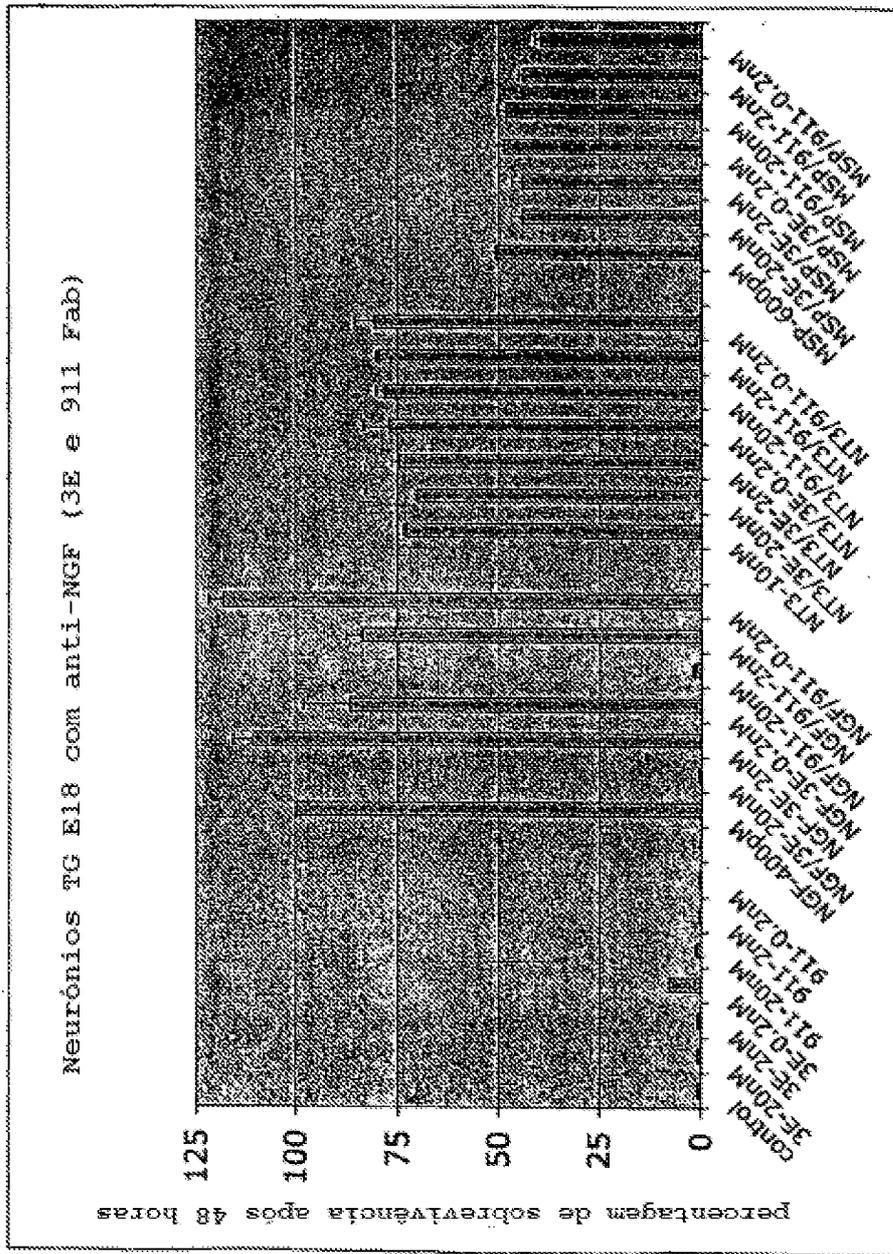


FIGURA 14

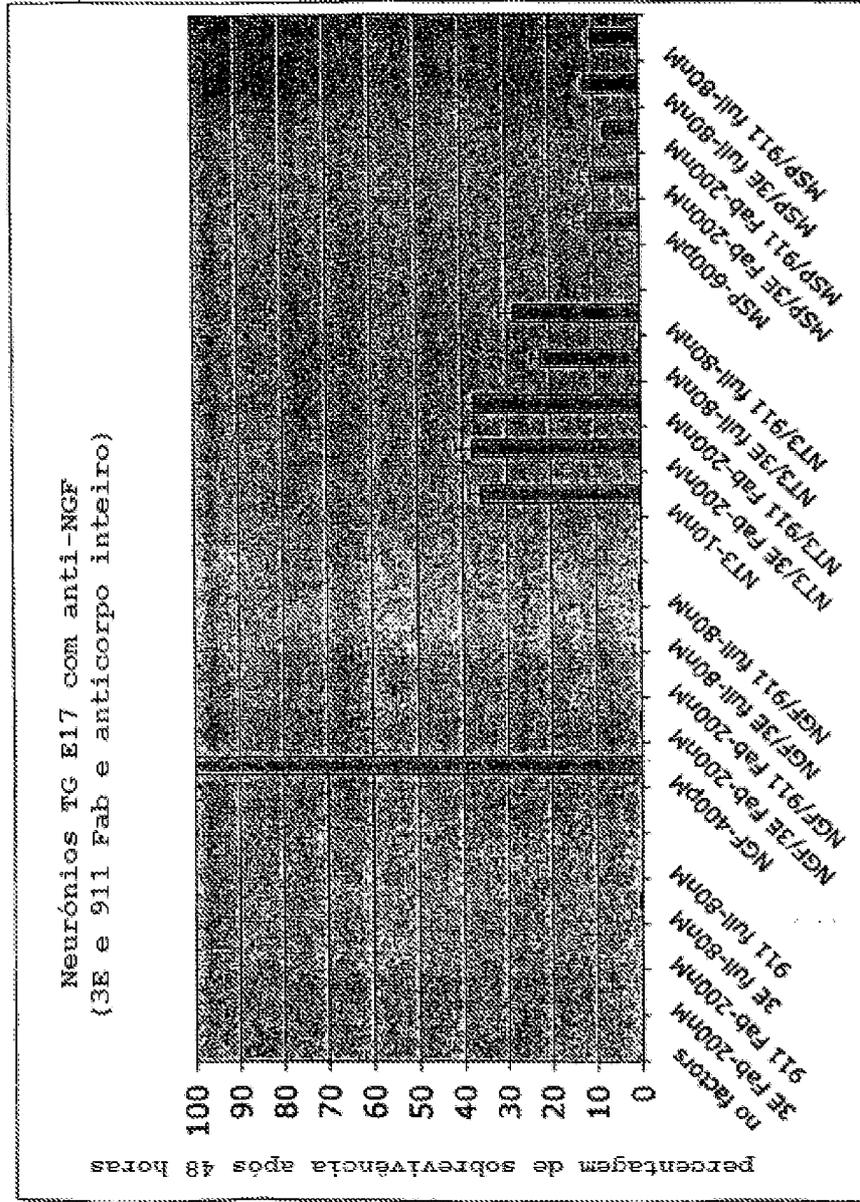


FIGURA 15

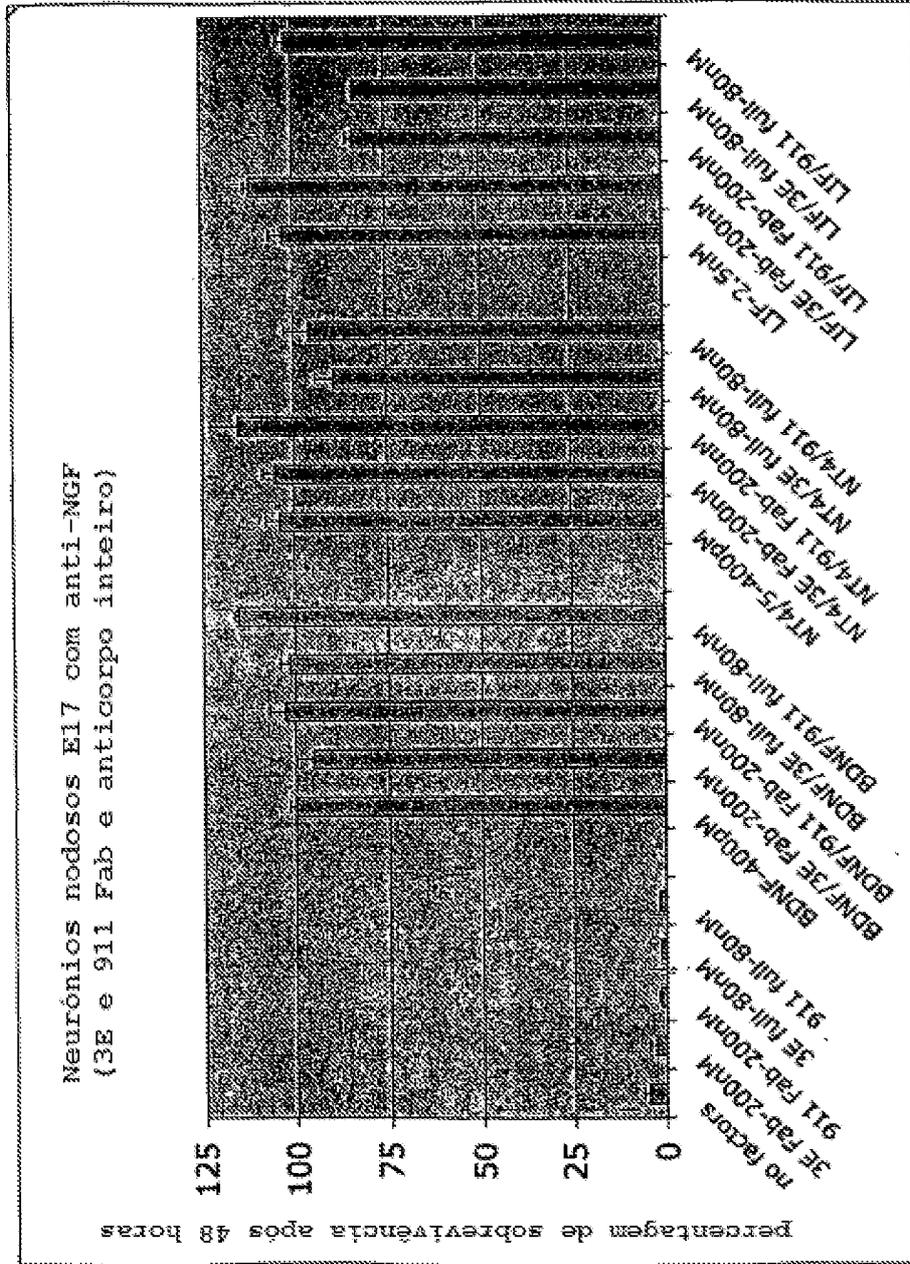


FIGURA 16

FIG. 18

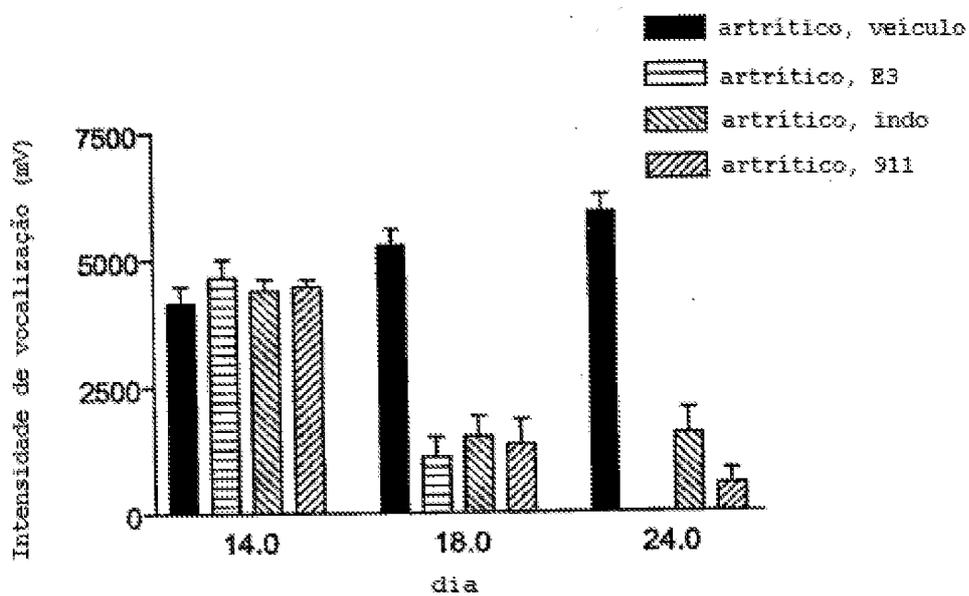


FIG. 19

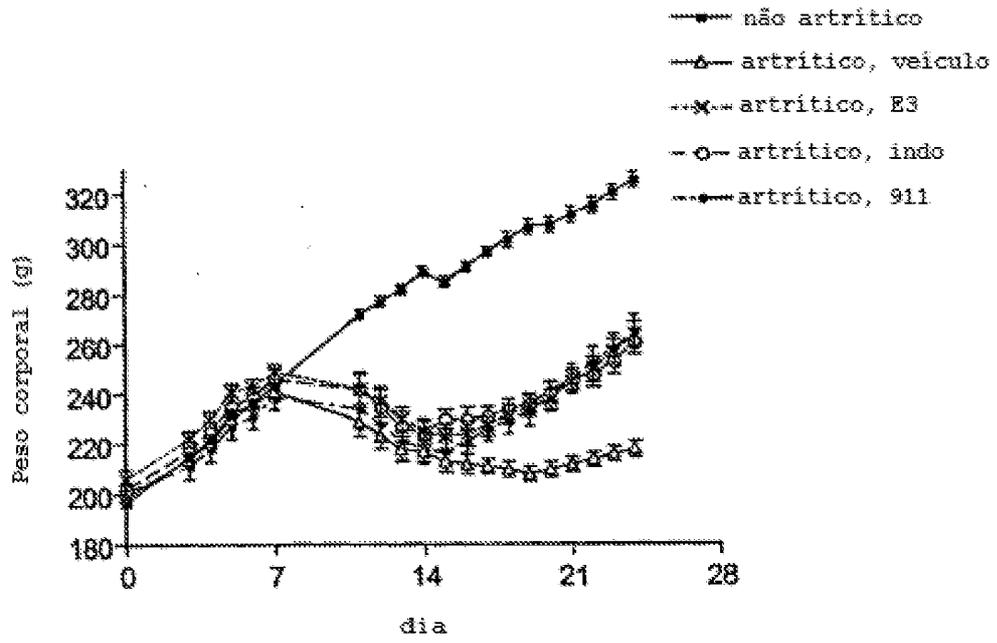


FIG. 20

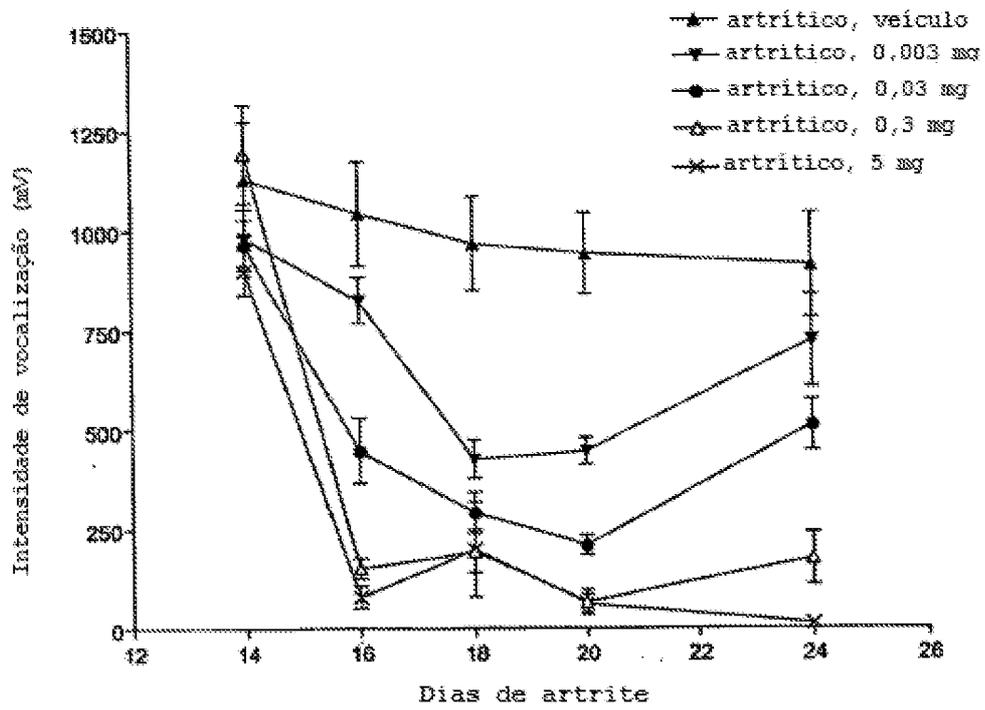


FIG. 21

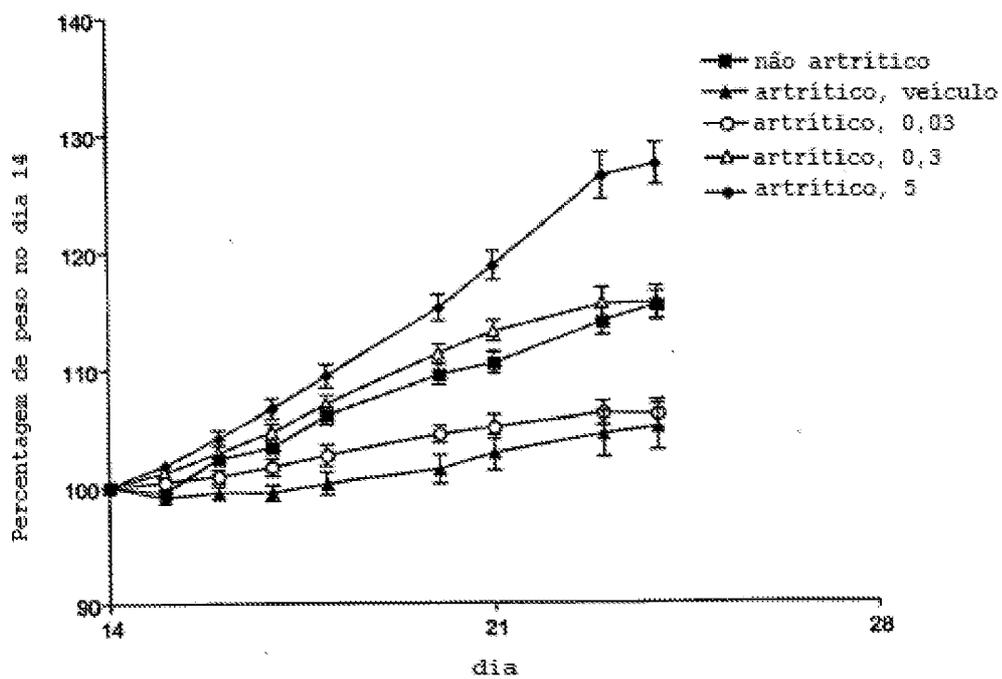


FIG. 22

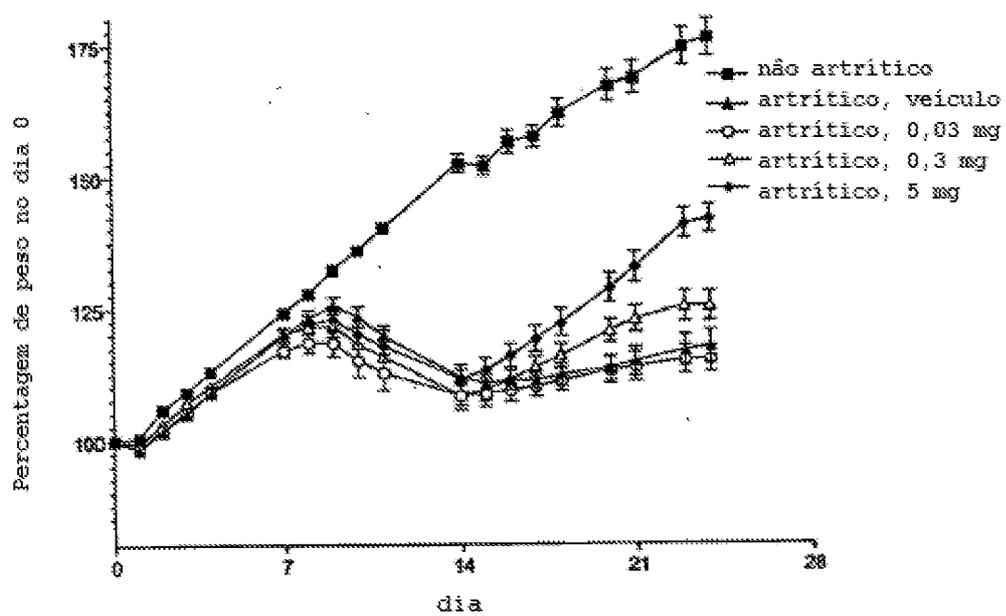


FIGURA 23A
 NUMERAÇÃO DE DOMÍNIO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA E3
 A- NUMERAÇÃO SEQUENCIAL DE PROTEÍNAS
 B- NUMERAÇÃO DE KABAT

CAIXAS: CDR CCSD KABAT, SUBLINHADO=CDR CCSD CHOTIA

A-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
B-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
C-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
	Q	V	Q	L	Q	R	S	G	F	G	L	V	K
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
	F	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G
H1													
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
	F	S	L	I	G	Y	D	L	N	W	I	R	Q
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
	F	F	G	K	G	L	E	W	I	G	I	I	W
H2													
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	V	K	S
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
	R	V	T	I	S	K	D	T	S	K	N	Q	F
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	
79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	
	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A

FIGURA 23A (CONT.)

						N3						
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A
Y	Y	Y	C	A	R	G	G	Y	W	F	A	T

105	106	107	108	109	109	110	111	112	113	114	115	116
100B	100C	100D	100E	101	102	103	104	105	106	107	108	109
100B	100C	100D	100E	101	102	103	104	105	106	107	108	109
E	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V

117 118 119
 110 111 112
 110 111 112
 T V S

FIGURA 23B
 NUMERAÇÃO DE DOMÍNIO VARIÁVEL DE CADEIA LEVE 3E
 A- NUMERAÇÃO SEQUENCIAL DE PROTEÍNAS
 B- NUMERAÇÃO DE KABAT
 C- NUMERAÇÃO DE CHOTHIA

CAIXAS: COM COMO KABAT SUBLINHADO=COM COMO CHOTHIA

A-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
B-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
C-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A
													L1
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
	S	V	Q	D	R	V	T	I	F	C	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>S</u>
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	27	
	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	Y	Q	Q	K
													L2
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
	F	G	K	A	F	K	L	L	F	Y	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>S</u>
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	G	V	F	S	K	F	S	G	S
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	66	
	G	S	Q	T	D	F	T	F	T	I	S	S	L
													L3
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
	Q	F	K	D	I	A	T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	
	<u>H</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	F	Q	Q	G	T	K	L

FIGURA 23B (CONT.)

105	105	107	108	109
105	106	106A	107	108
105	106	106A	107	108
S	I	K	R	T