

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

| | |
|--|--|
| (22) Data de pedido: 2006.04.11 | (73) Titular(es): RINAT NEUROSCIENCE CORP. 230 EAST GRAND AVENUE SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080 US |
| (30) Prioridade(s): 2005.04.11 US 104248 | |
| (43) Data de publicação do pedido: 2011.04.06 | |
| (45) Data e BPI da concessão: 2017.08.02 192/2017 | (72) Inventor(es): ARNON ROSENTHAL US DAVID L. SHELTON US PATRICIA ANN WALICKE US |
| | (74) Mandatário: MARIA TERESA DELGADO AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT |

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA TRATAR A DOR DA OSTEOARTRITE POR MEIO DA ADMINISTRAÇÃO DE UM ANTAGONISTA DE FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO E COMPOSIÇÕES CONTENDO O MESMO**

(57) Resumo:

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

RESUMO**"MÉTODOS PARA TRATAR A DOR DA OSTEOARTRITE POR MEIO DA
ADMINISTRAÇÃO DE UM ANTAGONISTA DE FATOR DE CRESCIMENTO DO
NERVO E COMPOSIÇÕES CONTENDO O MESMO"**

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

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS PARA TRATAR A DOR DA OSTEOARTRITE POR MEIO DA ADMINISTRAÇÃO DE UM ANTAGONISTA DE FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO E COMPOSIÇÕES CONTENDO O MESMO"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a anticorpos anti-NGF (tais como anticorpos antagonistas anti-NGF). A divulgação adicionalmente refere-se à utilização de um anticorpo antagonista anti-NGF no fabrico de um medicamento para a melhoria da função física num indivíduo tendo osteoartrite. A invenção refere-se adicionalmente a um anticorpo antagonista anti-NGF para utilização na melhoria da função física num indivíduo que tem osteoartrite.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O fator de crescimento dos nervos (NGF) foi a primeira neurotrofina a ser identificada, e sua função no desenvolvimento e sobrevivência tanto dos neurónios periféricos quanto centrais foi bem caracterizada. Demonstrou-se que o NGF é um fator crucial de sobrevivência e manutenção no desenvolvimento de neurónios periféricos simpáticos e embrionários sensoriais e de neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal. Smeyne *et al.*, Nature 368:246-249 (1994) e Crowley *et al.*, Cell 76:1001-1011 (1994). O fator de crescimento dos nervos regula positivamente a expressão de neuropéptidos em neurónios sensoriais (Lindsay e Harmer, Nature 337:362-364 (1989)) e a sua atividade é mediada através de dois recetores diferentes ligados a membrana, o recetor de tirosina quinase TrkA e o recetor de neurotrofina comum p75 (algumas vezes denominados recetores de NGF de "alta afinidade" e de "baixa afinidade", respetivamente). Chao *et al.*, Science 232:518-521 (1986). O recetor p75 é estruturalmente relacionado a outros membros da família de recetores do fator de necrose tumoral (Chao,

et al., Science 232:518-521 (1986)). Para uma revisão sobre NGF, veja-se Huang *et al.*, Annu. Rev. Neurosci. 24:677-736 (2001); Bibel *et al.*, Genes Dev. 14:2919-2937 (2000). Determinou-se a estrutura cristalina de NGF e NGF em complexo com o recetor trkA. Veja-se Nature 254:411 (1991); Nature 401:184-188 (1996).

Além de seus efeitos no sistema nervoso, o NGF tem sido crescentemente implicado em processos fora do sistema nervoso. Por exemplo, mostrou-se que NGF reforça a permeabilidade vascular (Otten, *et al.*, Eur J Pharmacol. 106:199-201 (1984)), reforça as reações imunes de células T e B (Otten, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10059-10063 (1989)), induz a diferenciação de linfócitos e proliferação de mastócitos e causa a libertação de sinais biológicos solúveis de mastócitos (Matsuda, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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 tenha sido mostrado que NGF adicionado exogenamente tem a capacidade de ter todos estes efeitos, é importante notar-se que somente raramente foi mostrado que NGF endógeno é importante em quaisquer destes processos *in vivo* (Torcia, *et al.*, Cell. 85(3):345-56 (1996)). Portanto, não está claro qual pode ser este efeito, se houver, para inibir a bioatividade do NGF endógeno.

NGF é produzido por uma série de tipos celulares incluindo, mastócitos (Leon, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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 musculares lisas (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 dos músculos esqueléticos (Schwartz, *et al.*, *J Photochem. Photobiol.* B66:195-200 (2002)). Foram encontrados recetores de NGF numa variedade de tipos celulares fora do sistema nervoso. Por exemplo, TrkA foi encontrado em monócitos humanos, linfócitos T e B e em mastócitos.

Observou-se uma associação entre aumento dos níveis de NGF e uma variedade de condições inflamatórias em pacientes humanos bem como em vários modelos animais. Estes 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)).

Consistentemente, um nível elevado de NGF nos tecidos periféricos está associado a hiperalgesia e inflamação e foi observado numa série de formas de artrite. A sinóvia dos pacientes afetados por artrite reumatoide expressa altos níveis de NGF ao passo que foi reportado que NGF em sinóvia não inflamada é indetetável (Aloe, *et al.*, *Arch. Rheum.* 35:351- 355 (1992)). Foram vistos resultados semelhantes em ratos com artrite reumatoide induzida experimentalmente (Aloe, *et al.*, *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:203-204 (1992)). Foram reportados níveis elevados de NGF em ratinhos artríticos transgênicos junto com um aumento no número de mastócitos (Aloe, *et al.*, *Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects* 15:139-143 (1993)). Publicação de Patente Internacional N° WO 02/096458 descreve a utilização de anticorpos anti-NGF de algumas propriedades no tratamento de vários distúrbios relacionados com o NGF tais como condição inflamatória (por exemplo, artrite

reumatoide). Relatou-se que um anticorpo anti-NGF purificado injetado em ratinhos artríticos transgênicos que possuem o gene do fator- α de necrose tumoral humana (TNF- α) causou a redução no número de mastócitos, bem como uma redução nos níveis de histamina e substância P dentro da sinóvia de ratinhos com artrite (Aloe *et al.*, *Rheumatol. Int.* 14: 249-252 (1995)). Mostrou-se que a administração exógena de um anticorpo contra NGF reduziu o aumento do nível de TNF- α que ocorre em ratinhos artríticos (Manni *et al.*, *Rheumatol. Int.* 18: 97-102 (1998)).

Além disso, observou-se o aumento da expressão de NGF e recetor de NGF de alta afinidade (TrkA) em condrócitos na osteoartrite humana (Iannone *et al.*, *Rheumatology* 41:1413-1418 (2002)).

Relataram-se anticorpos antagonistas anti-NGF de roedores. Veja-se, por exemplo, Hongo *et al.*, *Hybridoma* (2000) 19(3):215-227; Ruberti *et al.* (1993) *Cell. Molec. Neurobiol.* 13(5): 559-568. No entanto, quando anticorpos de roedores são usados terapêuticamente em seres humanos, desenvolve-se uma reação de anticorpo anti rato humano num número significativo de indivíduos tratados. Além disso, funções efetoras de anticorpos de rato comprovaram ser menos eficientes no contexto humano. Portanto, existe uma séria necessidade de anticorpos antagonistas anti-NGF, incluindo anticorpos antagonistas anti-NGF humanizados.

O documento US2004/237124 divulga um anticorpo anti-NGF denominado E3 ou 3E.

BREVE SUMÁRIO DA DIVULGAÇÃO

Num aspeto, a divulgação proporciona a utilização de um anticorpo antagonista anti-NGF no fabrico de um medicamento para melhorar a função física num indivíduo que tem osteoartrite. A divulgação proporciona ainda um anticorpo antagonista anti-NGF para utilização na melhoria da função física num indivíduo tendo osteoartrite. A

invenção proporciona adicionalmente a utilização de um anticorpo antagonista anti-NGF no fabrico de um medicamento para tratar a dor, melhorar a função física e melhorar a rigidez num indivíduo tendo osteoartrite. A invenção proporciona adicionalmente um anticorpo antagonista anti-NFG para utilização no tratamento da dor, melhoria da função física e melhoria da rigidez num indivíduo que tem osteoartrite.

Num aspeto, o anticorpo é um anticorpo maturado de afinidade e humanizado, E3, o qual se liga especificamente ao fator de crescimento dos nervos humano e de roedor ("NGF"). As sequências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve de E3 são mostradas nas Figuras 1A (SEQ ID NO: 1) e 1B (SEQ ID NO: 2), respetivamente. As porções de CDR de anticorpo E3 (incluindo CDRs de Chothia e Kabat) são representadas de maneira diagramática nas Figuras 1A e 1B. As sequências de aminoácidos de cadeias pesada e leve E3, e das CDRs individuais estendidas também são mostradas abaixo (Veja-se, "sequências de anticorpos", a seguir).

Em outro aspeto, o anticorpo é um anticorpo que compreende um fragmento ou uma região do anticorpo E3 (denominado de modo intercambiável "E3" no presente documento). Numa forma de realização, o fragmento é uma cadeia leve do anticorpo E3 conforme mostrado na Figura 1B. Em outra forma de realização, o fragmento é uma cadeia pesada do anticorpo E3 conforme mostrado na Figura 1A. Em ainda outra forma de realização, o fragmento contém uma ou mais regiões variáveis de uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada do anticorpo E3. Em ainda outra forma de realização, o fragmento contém uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada do anticorpo E3 conforme mostrado na Figura 1A e 1B.

Em outro aspeto, o anticorpo é um anticorpo que compreende uma cadeia leve que é codificada por um

polinucleótido que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N° PTA-4893 ou ATCC N° PTA-4894. Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleótido que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N° PTA-4895. Em outro aspeto, o anticorpo compreende (a) uma cadeia leve que é codificada por um polinucleótido que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N° PTA-4894 o ATCC N° PTA-4893; e (b) uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleótido que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N° PTA-4895 (por conveniência no presente documento, o um ou mais polinucleótidos produzidos por uma célula hospedeira depositada são referidos como tendo um número de depósito de ATCC N° PTA-4894, PTA-4893 e PTA-4895). Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve de uma cadeia leve que é codificada por um polinucleótido que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N° PTA-4894 ou ATCC N° PTA-4893. Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada de uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleótido que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N° PTA-4895. Em outro aspeto, o anticorpo compreende (a) uma região variável de cadeia leve de uma cadeia leve que é codificada por um polinucleótido que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N° PTA-4894 ou ATCC N° PTA-4893, e (b) uma região variável de cadeia pesada de uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleótido que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N° PTA-4895. Em ainda outro aspeto, o anticorpo compreende uma ou mais CDRs codificadas por (a) um polinucleótido que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N° PTA-4894; e/ou (b) uma

cadeia pesada que é codificada por um polinucleótido que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N° PTA-4895.

Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende a região constante de IgG2a de cadeia pesada humana. Em algumas formas de realização o anticorpo compreende a região constante capa de cadeia leve humana. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma região constante modificada, tal como uma região constante que é imunologicamente inerte, por exemplo, não desencadeia a lise mediada por complemento, ou não estimula citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (CCDA). Em outras formas de realização, a região constante é modificada conforme descrito em Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; Pedido PCT N° PCT/GB99/01441; e/ou Pedido de Patente do Reino Unido N.º 9809951.8. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo compreende uma região constante de IgG2a de cadeia pesada humana que compreende as seguintes mutações: A330P331 a S330S331 (numeração de aminoácidos com referência à sequência de IgG2a selvagem). Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende qualquer um ou mais dos seguintes: a) uma ou mais CDRs de anticorpo E3 mostrada nas Figuras 1A e 1B; b) CDR H3 da cadeia pesada de anticorpo E3 mostrada na figura 1A; c) CDR L3 da cadeia leve de anticorpo E3 mostrada na Figura 1B; d) três CDRs da cadeia leve de anticorpo E3 mostrada na Figura 1B; e) três CDRs da cadeia pesada de anticorpo E3 mostrada na Figura 1A; e f) três CDRs da cadeia leve e três CDRs da cadeia pesada, de anticorpo E3 mostrada nas Figuras 1A e 1B. O anticorpo pode compreender qualquer um ou mais dos seguintes: a) uma ou mais (uma, duas, três, quatro, cinco, ou seis) CDRs derivadas do anticorpo E3 mostrada nas Figuras 1A e 1B; b) uma CDR derivada de CDR H3 da cadeia pesada de anticorpo E3 mostrada na Figura 1A; e/ou c) uma

CDR derivada de CDR L3 da cadeia leve de anticorpo E3 mostrada na Figura 1B. Em algumas formas de realização, as CDRs podem ser CDRs Kabat, CDRs Chothia, ou uma combinação de CDRs Kabat e Chothia (denominadas CDRs "estendidas" ou "combinadas" no presente documento). Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a NGF (tal como NGF humano). Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende quaisquer das configurações de CDF (incluindo combinações, variantes, e etc.) descritas no presente documento.

Num aspeto, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 9, em que 134 é S, L, V A, ou I; e N35 é substituído com N, T ou S. Por conveniência no presente documento, "substituído" ou "é" neste contexto ou referência a um aminoácido refere-se a escolhas de um ou mais aminoácidos para uma dada posição. Conforme é claro, a substituição, ou escolha, pode ser o aminoácido representado numa SEQ ID ou Figura.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 10, em que M50 é M, I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; e em que Y110 é Y, K, S, R ou T.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e

em que Y110 é qualquer aminoácido.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 11, em que G98 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que G99 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve que compreende SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é qualquer aminoácido; T93 é qualquer aminoácido; e em que Y96 é Y ou R.

Num aspeto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 9, em que I34 é S, L, V, A, ou I; e N35 é N, T ou S.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 10, em que M50 é M, I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; e em que Y110 é Y, K, S, R ou T.

Em outro aspecto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido.

Em outro aspecto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que G98 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que G99 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido.

Em outro aspecto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q.

Em outro aspecto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T.

Em outro aspecto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R.

Em outro aspecto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é qualquer aminoácido; T93 é qualquer aminoácido; e em que Y96 é Y ou R.

Em outro aspecto, os anticorpos, incluindo anticorpos humanizados compreendem uma região variável de cadeia pesada que compreende a região CDR1 de SEQ ID NO: 9, em que I34 é S, L, V A, ou I; e N35 é N, T ou S; a região CDR2 de SEQ ID NO: 10, em que M50 é M, I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V; e a região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é

G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; em que Y110 é Y, K, S, R ou T. Em algumas formas de realização, a região variável de cadeia pesada compreende a região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; em que Y110 é qualquer aminoácido. Em outras formas de realização, a região variável de cadeia pesada compreende a região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que G98 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que G99 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma região variável de cadeia leve de anticorpo.

Em outro aspecto, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve que compreende a região CDR1 de SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q; a região CDR2 de SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T; e a região CDR3 de SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas formas de realização, a região variável de cadeia leve compreende a região CDR3 de SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é qualquer aminoácido; T93 é qualquer aminoácido; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma cadeia pesada de anticorpo.

Em outro aspecto, o anticorpo compreende (a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a região CDR1 de SEQ ID NO: 9, em que I34 é S, L, V A, ou I; e N35 é N, T ou

S; a região CDR2 de SEQ ID NO: 10, em que M50 é M, I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V; e a região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; em que Y110 é Y, K, S, R ou T; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a região CDR1 de SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q; a região CDR2 de SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T; e a região CDR3 de SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas formas de realização, a região variável de cadeia leve compreende a região CDR3 de SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é qualquer aminoácido; T93 é qualquer aminoácido; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas formas de realização, a região variável de cadeia pesada compreende a região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; em que Y110 é qualquer aminoácido. Em outras formas de realização, a região variável de cadeia pesada compreende a região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que G98 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que G99 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma cadeia leve de anticorpo.

Em outro aspeto, o anticorpo, incluindo um anticorpo humanizado compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 9, em que 134 é S, L, V A, ou I; e N35 é N, T

ou S; uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 10, em que M50 é M, I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V; e uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; em que Y110 é Y, K, S, R ou T. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; e em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido. Em outras formas de realização, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que G98 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que G99 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma região variável de cadeia leve de anticorpo.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q; uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T; e uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é qualquer aminoácido; T93 é qualquer aminoácido; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas formas de realização, o

anticorpo compreende ainda uma região variável de cadeia pesada de anticorpo.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende (a) uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 9, em que I34 é S, L, V A, ou I; e N35 é N, T ou S; uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 10, em que M50 é M, I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V; e uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; e em que Y110 é Y, K, S, R ou T; e (b) uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q; uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T; e uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é qualquer aminoácido; T93 é qualquer aminoácido; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; em que Y110 é qualquer aminoácido. Em outras formas de realização, o polipéptido compreende uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que G98 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que G99 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108

é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido. Em algumas formas de realização, o polipéptido compreende ainda uma região variável de cadeia leve de anticorpo.

Em outro aspeto, os anticorpos compreendem uma região variável de cadeia pesada que compreende: (a) uma região CDR1 de SEQ ID NO: 9, em que I34 é S, L, V A, ou I; e N35 é substituído com N, T ou S; (b) uma região CDR2 de SEQ ID NO: 10, em que M50 é I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V; e (c) uma região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; e em que Y110 é Y, K, S, R ou T; em que o anticorpo se liga a NGF.

Em outro aspeto, os anticorpos compreendem uma região variável de cadeia leve que compreende: (a) uma região CDR1 de SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q; (b) uma região CDR2 de SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T; e (c) uma região CDR3 de SEQ ID NO: 14, em que K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R; em que o anticorpo se liga a NGF.

Em outro aspeto, os anticorpos compreendem (a) uma região variável de cadeia pesada que compreende:

(i) uma região CDR1 de SEQ ID NO: 9, em que I34 é substituído com S, L, V A, ou I; e N35 é substituído com N, T ou S;

(ii) uma região CDR2 de SEQ ID NO: 10, em que M50 é I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V; e (iii) uma região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; em que Y110 é Y, K, S, R ou T; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende:

(i) uma região CDR1 de SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q; (ii) uma região CDR2 de SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T; e (iii) uma região CDR3 de SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R; em que o anticorpo se liga a NGF.

A menos que mencionado de outro modo, a escolha (por exemplo, substituição) de um aminoácido numa localização é selecionada independentemente da seleção de um aminoácido em qualquer outra localização.

Em algumas formas de realização, os anticorpos ligam-se a NGF (tal como NGF humano). Em algumas formas de realização, os anticorpos compreendem quaisquer das configurações de CDR (incluindo combinações, variações, e etc.) descritas no presente documento.

Conforme é evidente a partir da descrição no presente documento, a numeração de regiões variáveis usada no presente documento, é numeração sequencial. Um perito na especialidade entende prontamente que existe uma série de sistemas de numeração de anticorpos (tais como numeração Kabat e Chothia), e como converter a numeração sequencial em outro sistema de numeração, tal como numeração Kabat ou numeração Chothia.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma sequência CDR3) selecionada a partir de SEQ ID NO: 46 ou 50. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 6, 7, e 8. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 15.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR, tal como uma região CDR H1 e/ou CDR H2) selecionada a partir de (a) SEQ

ID NOS: 28 e/ou 29; (b) SEQ ID NOS: 30 e/ou 31; (c) SEQ ID NOS: 32 e/ou 33; (d) SEQ ID NOS: 34 e/ou 35; (e) SEQ ID NOS: 36 e/ou 37; (f) SEQ ID NOS: 38 e/ou 39; e (g) SEQ ID NOS: 40 e 41. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR H1) selecionada a partir de SEQ ID NOS: 28, 30, 32, 34, 36, 38, e 40. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR H2) selecionada a partir de SEQ ID NOS: 29, 31, 33, 35, 37, 39 e 41. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 6, 7, e 8. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 15.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR, tal como uma região CDR L1 e/ou CDR L2) selecionada a partir de (a) SEQ ID NOS: 18 e/ou 19; (b) SEQ ID NOS: 20 e/ou 21; e (c) SEQ ID NOS: 22 e/ou 23. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR L1) selecionada a partir de SEQ ID NOS: 18, 20, e 22. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR L2) selecionada a partir de SEQ ID NOS: 19, 21, e 23. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 6, 7, 8. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 15.

Em outro aspeto, o anticorpo 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 NOS: 51 e/ou 52; (b) SEQ ID NOS: 55 e/ou 56; (c) SEQ ID NOS: 57 e/ou 58; (c) SEQ ID NOS: 59 e/ou 60; (d) SEQ ID NOS: 61 e/ou 62; (e) SEQ ID NOS: 63 e/ou 64. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR L3) selecionada a partir de SEQ ID NOS: 51, 55, 57, 59, 61, e 63. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR H3) selecionada a partir de SEQ ID NOS: 52, 56, 58, 60, 62, e 64. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma sequência de aminoácidos mostrada numa ou mais das SEQ ID NOS: 18, 19, 30 e 31. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 6, 7, e 8. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo compreende ainda uma ou mais das sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 15.

Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma ou mais de uma sequência de aminoácidos (tal como uma região CDR) mostrada nas SEQ ID NOS: 61, 63, 18, 19, 30 e 31.

Num aspeto, o anticorpo antagonista anti-NGF que se liga a NGF (tal como NGF humano) com uma alta afinidade. Em algumas formas de realização, alta afinidade é (a) ligação de NGF com uma K_d de menos de cerca de 2 nM (tal como qualquer 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 menor), e/ou uma k_{off} mais lenta do que cerca de $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; e/ou (b) inibição (redução, e/ou bloqueio) da sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI_{50} (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM, ou menos; e/ou (c) inibição (redução, e/ou bloqueio) da sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI_{50} (na

presença de cerca de 1.5 pM de NGF) de cerca de qualquer de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM, ou menos; e/ou (d) inibição (redução, e/ou bloqueio) da sobrevida dependente de NGF de rato de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer de 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) inibição (redução, e/ou bloqueio) da sobrevida dependente de NGF de rato de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI50 (na presença de cerca de 1,5 pM de NGF) de cerca de qualquer de 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) e/ou ligação de NGF com maior afinidade do que o recetor trkA.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um anticorpo, em que os anticorpos (a) se ligam a NGF (tal como NGF humano) com uma K_D de menos de cerca de 2 nM (tal como qualquer 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 sobrevida dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM, ou menos; e/ou (c) inibem a sobrevida dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI50 (na presença de cerca de 1,5 pM de NGF) de cerca de qualquer de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM, ou menos; e/ou ligam NGF com maior afinidade do que o recetor trkA. Em algumas formas de realização, os anticorpos (a) se ligam a NGF com uma K_D de menos de cerca de 2 nM; e/ou (b) inibem a sobrevida dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI50 de cerca de 100 pM ou menos, em que a CI50 é medida na presença de cerca de 15 pM de NGF; e/ou (c) inibem a

sobrevida dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI50 de cerca de 10 pM ou menos, em que a CI50 é medida na presença de cerca de 1.5 pM de NGF, em que a CI50 é medida na presença de cerca de 15 pM de NGF. Em algumas formas de realização, os anticorpos (a) se ligam a NGF com uma K_D de menos de cerca de 100 pM; e/ou (b) inibem a sobrevida dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI50 de cerca de 20 pM ou menos, em que a CI50 é medida na presença de cerca de 15 pM de NGF; e/ou (c) inibem a sobrevida dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI50 de cerca de 2 pM ou menos, em que a CI50 é medida na presença de cerca de 1,5 pM de NGF.

Conforme é evidente a partir da descrição no presente documento, excluídos especificamente da divulgação estão formas de realização de polipéptidos consistindo na sequência de aminoácidos idêntica a uma sequência de aminoácidos de anticorpo monoclonal de ratinho, 911. As sequências de CDR estendidas de Mab 911 são mostradas nas Figuras 1A e 1B, e nas SEQ ID NOS: 9-14.

Em algumas formas de realização, divulgação quaisquer dos anticorpos acima são isolados. Em algumas formas de realização, o anticorpo é essencialmente purificado. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo é maturado por afinidade. Em outras formas de realização, o anticorpo é um anticorpo antagonista. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende sequências de estrutura humana. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo compreende um ou mais resíduos de estrutura não humana. Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a NGF (tal como NGF humano) com uma K_D de 2 nM ou menos. Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende uma ou mais (tais como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou mais) substituições de aminoácidos humanos em relação a uma sequência de aminoácidos não humana (tal como uma sequência de região

variável, tais como uma sequência de CDR, tal como uma sequência de estrutura). Em algumas formas de realização, o anticorpo compreende pelo menos 1, pelo menos 2, ou mais tal como pelo menos 3, 4, 5, 6, ou mais substituições de aminoácidos em relação a uma sequência de aminoácidos do polipéptido de origem (tal como uma sequência de aminoácidos do anticorpo 911, tal como qualquer uma ou mais das SEQ ID NOs 9-14). Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação do anticorpo foi alterada (em algumas formas de realização, aumentada) em relação a uma afinidade de anticorpo de origem (tal como Mab 911). Em ainda outras formas de realização, a afinidade de ligação do anticorpo é menor do que a afinidade de ligação do recetor trkA para NGF (tal como NGF humano). Em algumas formas de realização, os anticorpos são anticorpos humanos. Em outras formas de realização, os anticorpos são anticorpos humanizados. Em ainda outras formas de realização, os anticorpos são anticorpos monoclonais. Em algumas formas de realização, o anticorpo é um anticorpo maturado por afinidade.

A divulgação proporciona polinucleótidos (incluindo polinucleótido isolado) que compreende polinucleótidos que codificam quaisquer das formas de realização acima.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado que compreende um polinucleótido que codifica um fragmento ou uma região do anticorpo E3 (de maneira intercambiável denominado "E3" no presente documento). Numa forma de realização, o fragmento é uma cadeia leve do anticorpo E3 conforme mostrado na Figura 1B. Em outra forma de realização, o fragmento é uma cadeia pesada do anticorpo E3 conforme mostrado na Figura 1A. Em ainda outra forma de realização, o fragmento contém uma ou mais regiões variáveis de uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada do anticorpo E3. Em ainda outra forma de realização, o fragmento contém uma ou mais regiões de determinação da complementaridade (CDRs) de uma cadeia leve e/ou uma cadeia

pesada do anticorpo E3 conforme mostrado nas Figuras 1A e 1B.

Em outro aspecto, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado que compreende um polinucleótido que codifica o anticorpo E3. Em algumas formas de realização, o polinucleótido compreende qualquer um ou ambos os polinucleótidos mostrados nas Figuras 2 e 3.

Em outro aspecto, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado que codifica uma cadeia leve E3 com um número de depósito de ATCC N° PTA-4893 ou ATCC N° PTA-4894. Em outro aspecto, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado que codifica uma cadeia pesada E3 com um número de depósito de ATCC N° PTA-4895. Em ainda outro aspecto, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado que compreende (a) uma região variável codificada no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N° PTA-4893 ou PTA-4894 e (b) uma região variável codificada no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N° PTA-4895. Em outro aspecto, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado que compreende (a) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N° PTA-4893 ou PTA-4894; e/ou (b) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N° PTA-4895.

Em outro aspecto, a divulgação proporciona polinucleótidos que codificam quaisquer dos anticorpos (incluindo fragmentos de anticorpos) ou polipéptidos descritos no presente documento.

Em outro aspecto, a divulgação proporciona vetores (incluindo vetores de expressão e clonagem) e células hospedeiras que compreendem quaisquer dos polinucleótidos descritos no presente documento.

Conforme é evidente a partir da descrição no presente documento, especificamente incluídas da divulgação estão formas de realização de polinucleótidos consistindo na

sequência de polinucleótidos idênticas a uma sequência de polinucleótidos de anticorpo monoclonal de ratinho, 911. As sequências de CDR estendidas de Mab 911 são mostradas nas Figuras 1A e 1B, e na SEQ ID NOS: 9-14.

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

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um complexo de NGF ligado por anticorpo E3. Em outro aspeto, o complexo é isolado. Em outro aspeto, o complexo é substancialmente purificado.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um complexo de NGF ligado por quaisquer dos anticorpos ou polipéptidos descritos no presente documento. Em outro aspeto, o complexo é isolado. Em outro aspeto, o complexo é substancialmente purificado.

Em outro aspeto, a divulgação é uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo antagonista anti-

NGF, tal como composições farmacêuticas que compreendem o anticorpo E3 ou um anticorpo que compreende um fragmento do anticorpo E3, e um excipiente farmacêuticamente aceitável, para utilização na melhora da função física num indivíduo que tem osteoartrite.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um método para gerar anticorpo E3 que compreende preparar uma célula hospedeira que compreende um vetor de expressão que codifica o anticorpo E3; cultivar a célula hospedeira ou progénie da mesma sob condições que permitem a produção do anticorpo E3; e purificar o anticorpo E3. Em algumas formas de realização, o vetor de expressão compreende uma ou ambas as sequências de polinucleótidos mostrada nas Figuras 2 e 3.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um método para gerar o anticorpo E3 que compreende expressar 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° PTA-4893 e/ou ATCC N° PTA-4894, e o polinucleótido que codifica a cadeia pesada E3 tem um número de depósito de ATCC N° PTA-4895; geralmente seguida por recuperação e/ou isolamento do anticorpo.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona métodos para gerar quaisquer dos polipéptidos (tais como anticorpos) descritos no presente documento, por expressão de um ou mais polinucleótidos que codificam o anticorpo (o qual pode ser separadamente expresso como uma única cadeia leve ou pesada, ou tanto uma cadeia leve quanto uma cadeia pesada podem ser expressa por um vetor) numa célula adequada, geralmente seguido por recuperação e/ou isolamento do anticorpo ou polipéptidos de interesse.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um método para antagonizar a atividade biológica de NGF (tal como NGF

humano) usando quaisquer dos polipéptidos (incluindo anticorpos tais como anticorpo E3) descritos no presente documento. Numa forma de realização, o método compreende contactar fator de crescimento dos nervos humano com quaisquer dos polipéptidos (incluindo anticorpo E3) descritos no presente documento, por meio do qual a atividade de NGF (tal como a atividade do fator de crescimento dos nervos humano) é antagonizada, reduzida, bloqueada, ou suprimida.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um método para detetar NGF usando quaisquer dos polipéptidos (incluindo anticorpos, tais como o anticorpo E3) descritos no presente documento. A presença de NGF é detetada por meio da deteção de um complexo entre NGF e quaisquer dos polipéptidos descritos no presente documento, (tais como anticorpo E3). O termo "deteção" conforme usado no presente documento, inclui deteção qualitativa e/ou quantitativa (medição dos níveis) com ou sem referência a um controlo.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um método para tratar dor por administração de uma quantidade eficaz de uma composição que compreende o anticorpo E3 ou quaisquer das formas de realização de polipéptidos (incluindo anticorpo) ou polinucleótidos descritas no presente documento. Em algumas formas de realização, a dor é dor pós-cirúrgica.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um método para prevenir ou tratar a dor da artrite reumatoide num indivíduo por meio da administração de uma quantidade eficaz de anticorpo antagonista anti-NGF ao indivíduo. Foi mostrado de acordo com a divulgação que um anticorpo antagonista anti-NGF é capaz de inibir ou bloquear a dor associada com artrite reumatoide. Em algumas formas de realização, a dor é aliviada no prazo de cerca de 4 dias após administrar o anticorpo antagonista anti-NGF. Em algumas formas de realização, a dor é aliviada antes de

observar ou na ausência de uma indicação de melhoria da condição inflamatória no indivíduo.

Noutro aspeto, a divulgação proporciona métodos para reduzir a incidência de dor por artrite reumatoide, melhorar a dor da artrite reumatoide, suprimir a dor da artrite reumatoide, paliar a dor da artrite reumatoide, e/ou atrasar o início, desenvolvimento, ou progressão da dor da artrite reumatoide num indivíduo, o dito método compreendendo administrar uma quantidade eficaz de anticorpo antagonista anti-NGF ao indivíduo.

Noutro aspeto, a divulgação proporciona métodos para tratar a caquexia (perda de peso) inflamatória associada com a artrite reumatoide num indivíduo compreendendo administrar uma quantidade eficaz de anticorpo antagonista anti-NGF.

Noutro aspeto, a invenção é uma utilização médica para tratar a dor da osteoartrite, melhorar a função física e melhorar a rigidez num indivíduo administrando uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF ao indivíduo.

Noutro aspeto, a utilização médica proporciona a redução da incidência da dor da osteoartrite, melhorar a dor da osteoartrite, suprimir a dor da osteoartrite, aliviar a dor da osteoartrite, e/ou retardar o início, o desenvolvimento, ou a progressão da dor da osteoartrite num indivíduo, compreendendo o dito método administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) ao indivíduo.

Noutro aspeto, a divulgação proporciona a utilização de um anticorpo antagonista anti-NGF no fabrico de um medicamento para melhorar a função física num indivíduo tendo osteoartrite. A invenção proporciona adicionalmente um anticorpo antagonista anti-NGF para utilização na melhoria da função física num indivíduo tendo osteoartrite. A invenção proporciona adicionalmente a utilização de um

anticorpo antagonista anti-NGF no fabrico de um medicamento para tratar a dor, melhorar a função física e melhorar a rigidez num indivíduo tendo osteoartrite. A invenção proporciona adicionalmente um anticorpo antagonista anti-NGF para utilização no tratamento da dor, melhoria da função física e melhoria da rigidez num indivíduo tendo osteoartrite.

Noutro aspeto, a divulgação proporciona utilizações médicas para melhorar a rigidez num indivíduo tendo osteoartrite, a dita utilização compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) ao indivíduo.

Em algumas formas de realização, o indivíduo é um ser humano. Em algumas formas de realização, para tratar dor da osteoartrite, a frequência de dosagem de anticorpo antagonista anti-NGF está entre uma vez a cada semana e uma vez a cada 10 semanas, ou menos frequente.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona *kits* e composições que compreendem qualquer uma ou mais das composições descritas no presente documento. Estes *kits*, geralmente dentro de embalagem adequada e providos com instruções apropriadas, são úteis para quaisquer das utilizações médicas descritas no presente documento. A divulgação também proporciona composições farmacêuticas para utilização em quaisquer das utilizações médicas descritas no presente documento, cujas composições compreendem uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF e um veículo farmacêuticamente aceitável.

A divulgação também proporciona quaisquer das composições e *kits* descritos para qualquer utilização descrita no presente documento, quer no contexto de utilização como medicamento e/ou utilização para o fabrico de um medicamento.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A FIGURA 1A: mostra a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada do anticorpo E3 (marcada com "6" e "5" + maturação de afinidade H3). As CDRs Chothia e CDRs Kabat são representadas por texto sublinhado e por texto em negrito e em itálico, respectivamente. A Figura 1A também mostra o alinhamento das seguintes sequências de aminoácidos de região variável de cadeia pesada; (2) sequência aceitadora da linha germinal humana VH4-59 (marcada com "VH4-59" ou "2") (SEQ ID NO: 69); (3) as sequências aceitadoras enxertadas com as CDRs estendidas do anticorpo de ratinho 911 (marcadas "enxertada com CDR" ou "3") (SEQ ID NO: 70); (4) as sequências aceitadoras enxertadas com CDR incluindo a substituição V71K (marcadas "3+mutação de uma estrutura" ou "4") (SEQ ID NO: 71); (5) o clone contendo CDRs de afinidade maturadas H1 e H2 (marcadas "5" ou "4+ maturação de afinidade H1, H2") (SEQ ID NO: 72); e anticorpo E3 (conforme descrito acima).

A FIGURA 1B: mostra a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve do anticorpo E3 (marcada com "5" ou "4 + maturação de afinidade L3). As CDRs Chothia e CDRs Kabat são representadas por texto sublinhado e texto em negrito e em itálico, respectivamente. A FIGURA 1B também mostra o alinhamento das seguintes sequências de aminoácidos de região variável de cadeia leve: (2) sequência aceitadora da linha germinal humana 08 (marcada com "08" ou "2") (SEQ ID NO: 73); (3) as sequências aceitadoras enxertadas com as CDRs estendidas do anticorpo ratinho 911 (marcadas "enxertada com CDR" ou "3") (SEQ ID NO: 74); (4) as sequências aceitadoras enxertadas com CDR (marcadas "3+ maturação de afinidade L1, L2" ou "4") (SEQ ID NO: 75); (5) o clone contendo CDRs de afinidade maturada L1 e L2 (marcadas "5" ou "4+ maturação de afinidade L3"); e anticorpo E3 (conforme

descrito acima).

A FIGURA 2: mostra um polinucleótido que compreende uma sequência de polinucleótido que codifica a região variável de cadeia pesada do anticorpo E3 (SEQ ID NO: 76).

A FIGURA 3: mostra um polinucleótido que compreende uma sequência de polinucleótido que codifica a região variável de cadeia leve do anticorpo E3 (SEQ ID NO: 77).

A FIGURA 4: é um gráfico representando a sobrevivência dependente de NGF de neurónios E13.5 na presença de 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.

A FIGURA 5: é um gráfico que representa o efeito de bloqueio de NGF de vários Fabs na presença de ou 0,04 ng/ml de NGF humano (cerca de 1,5 pM; mostrada no painel inferior) ou 0,4 ng/ml de NGF humano (cerca de 15 pM; mostrada no painel superior). Foi avaliada a sobrevivência de neurónios trigeminais de ratinho E13.5 em várias concentrações de Fab E3; 911 Fab murino; e Fab H19-L129 e Fab 8L2-6D5. A CI50 (em pM) foi calculada para cada Fab em cada concentração de NGF, e é mostrada no Quadro 9. Fab E3 bloqueou fortemente a sobrevivência de neurónios trigeminais dependentes de NGF humanos, com uma CI50 de cerca de 21 pM na presença de 15 pM de humano NGF, e uma CI50 de cerca de 1,2 pM na presença de 1,5 pM de NGF humano. Fabs 3C e H19-L129 também bloquearam fortemente a sobrevivência de neurónios trigeminais dependentes de NGF humanos. Em ambos os painéis, o eixo X corresponde à concentração de anticorpos (nM) e o eixo Y corresponde aos neurónios contados. 1,5 pM de NGF foi em torno da CI50, enquanto 15 pM representou uma concentração saturante de NGF.

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

de rato (cerca de 1,5 pM; mostrada no painel inferior) ou 0,4 ng/ml NGF de rato (cerca de 15 pM; mostrada no painel superior). A sobrevida de neurónios trigeminais de ratinho E13.5 em várias concentrações de Fab E3; Fab 911 murino; e Fab H19-L129 e 8L2-6D5 foi avaliada conforme descrito acima. A CI50 (em pM) foi calculada para cada Fab em cada concentração de NGF, e é mostrada no Quadro 9. Fab E3 bloqueou fortemente a sobrevida de neurónios trigeminais dependentes de NGF humanos, com uma CI50 de cerca de 31,6 pM na presença de 15 pM de NGF de rato, e uma CI50 de cerca de 1,3 pM na presença de 1,5 pM de NGF de rato. Fabs 3C e H19-L129 também bloquearam fortemente a sobrevida de neurónios trigeminais dependentes de NGF de rato. 1,5 pM de NGF foi em torno da CI50, enquanto 15 pM representou uma concentração saturante de NGF. Em ambos os painéis, o eixo X corresponde à concentração de anticorpos (nM) e o eixo Y corresponde aos neurónios contados.

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

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

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

A FIGURA 10: é um gráfico que mostra os resultados de

análise BIAcore da afinidade de ligação a NGF humano do anticorpo E3 (Fab) (referido como "3E Fab"). E3 ligou NGF humano com uma KD de cerca de 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 $4,2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$).

A FIGURA 11: é um gráfico representando que o anticorpo E3 bloqueia a interação de NGF com seus recetores, trkA e p75, conforme avaliado por percentagem de ligação detetada entre NGF e trkA (mostrado em círculos pretos) e NGF e p75 (mostrados como quadrados vazios). O eixo X corresponde à concentração do anticorpo 3E (Fab) e o eixo Y corresponde à ligação de NGF (percentagem máxima de RU). O aumento das concentrações de Fab E3 bloqueou a interação de NGF tanto com p75 quanto com trkA, conforme mostrado por redução de sinal (medida em RU). Quando a concentração de anticorpos E3 (Fab) equivaleu à concentração de NGF, não foi observada ligação de NGF (conforme mostrado por um sinal de zero).

A FIGURA 12: é um gráfico representando a capacidade de bloqueio do NGF humano de anticorpo total E3 e Fab E3. Foi avaliada a sobrevida de neurónios trigeminiais de ratinho E13.5 na presença de NGF humano e várias concentrações de Fab E3 e anticorpo E3. O eixo X corresponde à ligação de locais de NGF (nM) e o eixo Y corresponde à contagem normalizada de neurónios trigeminiais (TG). O anticorpo total E3 e Fab 3E apresentaram níveis semelhantes de inibição da sobrevida dependente de NGF de neurónios trigeminiais quando a concentração de anticorpo total e Fab foram normalizadas para o número de locais de ligação de NGF (Fab tem um local de ligação e o anticorpo total tem dois locais de ligação).

A FIGURA 13: é um gráfico representando a capacidade de várias concentrações (20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 0,0064, 0,00128, e 0,0 nM) do anticorpo E3 (triângulos sólidos;

referido como "3E"), anticorpo 911 (círculos sólidos), e uma imunoadesina de recetor de trkA (quadrados sombreados; referida como "trkA-Fc) para inibir a sobrevida 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 do anticorpo (nM) e a concentração de Y corresponde aos neurónios contados. Estes resultados demonstraram que o anticorpo E3 bloqueou NGF significativamente melhor do que quer o anticorpo anti-NGF monoclonal de ratinho 911 quer a imunoadesina de trkA.

A FIGURA 14: é um gráfico representando que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 (denominado "3E na figura") ou Fab 911 não inibiram a sobrevida neuronal promovida por NT3, NT4/5 e MSP, mesmo em concentrações de anticorpos tão elevadas quanto 200 nM. Os dados representaram percentagem de sobrevida média depois de 48 horas em cultura (\pm erro padrão da média, $n = 3$ para cada ponto de dados) relativa à sobrevida observada no controlo positivo para cada experiência (100% de sobrevida de neurónios trigeminais cultivados na presença de concentração de NGF saturante). Várias concentrações (20 nM, 2 nM, ou 0,2 nM) de E3 Fab (denominado "3E" na figura) e anticorpo de ratinho 911 Fab foram usadas na presença de neurotrofina não adicionada (denominada "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 representando que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 (Fab ou anticorpo total) (denominado "3E na figura") ou anticorpo de ratinho 911 (Fab ou anticorpo total) não inibiu a sobrevida neuronal promovida por NT3, NT4/5 e MSP, mesmo em concentrações de anticorpos tão elevadas quanto 200 nM. Várias concentrações (200 nM e 80 nM) de E3 Fab e anticorpo

total e anticorpo de ratinho 911 anticorpo total e Fab foram usadas na presença de neurotrofinas não adicionadas (denominadas "sem fatores"), 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 16: é um gráfico representando que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 ou Fab E3 não inibiu a sobrevivência de neurónios nodosos E17 promovida por BDNF, NT4/5 ou LIF. Anticorpo antagonista anti-NGF de ratinho 911 também foi testado, e foram observados resultados semelhantes. Várias concentrações (200 nM ou 80 nM) de anticorpo total E3 (denominado "3E na figura"), Fab E3, anticorpo total 911, ou Fab 911 foram testadas na presença de neurotrofinas não 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).

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

A FIGURA 18: é um gráfico que demonstra a reação nociceptiva em ratos artríticos (modelo de artrite reumatoide) depois da administração de anticorpos anti-NGF (E3 e 911) no D14 e D19. E3 (1 mg/kg, i.v. no dia 14 e dia 19), 911 (.10 mg/kg, i.v. no dia 14 e dia 19), ou indo (indometacina 3 mg/kg, por via oral diariamente durante 10 dias) foram administrados a ratinhos artríticos. Os valores da intensidade da vocalização são expressos em mV como médias \pm e.p.m..

A FIGURA 19: é um gráfico que demonstra os efeitos de anticorpos anti-NGF sobre o peso corporal na artrite em ratos (modelo de artrite reumatoide) depois da administração de anticorpos anti-NGF em D14 e D19. E3 (1 mg/kg, i.v. no dia 14 e dia 19), 911 (10 mg/kg, i.v. no dia 14 e dia 19), ou indo (indometacina 3 mg/kg, por via oral diariamente durante 10 dias) foram administrados a ratinhos artríticos. Os valores do peso corporal são expressos em gramas como média \pm e.p.m..

A FIGURA 20: é um gráfico que demonstra a reação nociceptiva em ratos artríticos (modelo de artrite reumatoide) depois da administração de diferentes doses de anticorpo anti-NGF E3 (0,003 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg, e 5 mg/kg) em D14 e D18. Os valores da intensidade da vocalização são expressos em mV como médias \pm e.p.m..

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

A FIGURA 22: é um gráfico que demonstra os efeitos de anticorpo anti-NGF E3 sobre a perda de peso em ratos artríticos (modelo de artrite reumatoide) depois da administração de diferentes doses de anticorpo anti-NGF E3 (0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg, e 5 mg/kg) em D14 e D18. Os valores de peso corporal foram normalizados para o Dia 0.

A 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 usando numeração sequencial, numeração de Kabat, e numeração de Chothia.

A FIGURA 24 representa as alterações na intensidade da dor diária média depois da administração de anticorpo anti-NGF E3 comparada com a avaliação inicial no dia 0. 0

eixo Y corresponde à redução na intensidade da dor diária média (pontuação de VAS) comparada com a intensidade da dor diária média no dia 0. O eixo X corresponde a dias depois da administração de anticorpo anti-NGF E3.

A FIGURA 25 representa a pontuação média de VAS depois da administração de anticorpo anti-NGF E3. "SE" refere-se a erro padrão.

A FIGURA 26 representa percentagem de redução máxima na diferença da intensidade da dor somada (SPID) do dia 2 ao dia 14 e do dia 2 ao dia 28 depois da administração de anticorpo anti-NGF E3.

A FIGURA 27 representa a resposta média quadrada mínima (LSM) para WOMAC, subescala da dor, subescala da função física, e subescala da rigidez do dia 1 ao dia 28 depois da administração de diferentes doses (3 µg/kg, 10 ng/kg, 30 µg/kg, 100 µg/kg, e 300 µg/kg) de anticorpo anti-NGF E3. "SE" refere-se a erro padrão. Os eixos X correspondem à dose de anticorpo anti-NGF E3 administrada. "*" indica $P < 0,05$ comparado com a avaliação inicial segundo o ensaio de Dunnett.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA DIVULGAÇÃO

A divulgação revelada no presente documento proporciona a utilização de um anticorpo antagonista anti-NGF no fabrico de um medicamento para melhorar a função física num indivíduo tendo osteoartrite. A invenção proporciona adicionalmente um anticorpo antagonista anti-NGF para utilização na melhoria da função física num indivíduo tendo osteoartrite. A invenção proporciona adicionalmente a utilização de um anticorpo antagonista anti-NGF no fabrico de um medicamento para tratar a dor, melhorar a função física e melhorar a rigidez num indivíduo tendo osteoartrite. A invenção proporciona adicionalmente um anticorpo antagonista anti-NGF para utilização no tratamento da dor, na melhoria da função física e na melhoria da rigidez num indivíduo com osteoartrite.

A invenção divulgada no presente documento proporciona a utilização de anticorpos antagonistas anti-NGF que se ligam ao NGF (tais como o NGF humano) com alta afinidade. A invenção proporciona ainda anticorpos derivados de E3 que se ligam a NGF, e utilizações médicas destes anticorpos. Em algumas formas de realização, a invenção proporciona um anticorpo humanizado, E3, que se liga ao fator de crescimento dos nervos ("NGF"), e utilizações médicas deste anticorpo. A divulgação também proporciona utilizações médicas dos anticorpos E3 que se ligam a NGF.

Técnicas Gerais

A prática da presente invenção empregará, a menos que indicado de outro modo, técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular, bioquímica e imunologia, as quais estão dentro do âmbito da especialidade. As técnicas referidas são explicadas integralmente na literatura, tais 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 e P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and 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 e 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 e 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 e C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow e D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti e 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 ligação específica a um alvo, tal como um hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, e etc., através de pelo menos um local de reconhecimento antigénico, localizado na região variável da molécula de imunoglobulina. Conforme usado no presente documento, o termo abrange não somente anticorpos intactos policlonais ou monoclonais, mas 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 antigénico. Um anticorpo inclui um anticorpo de qualquer classe, tal como IgG, IgA, ou IgM (ou subclasse das mesmas), e o anticorpo não precisa ser de qualquer classe em particular. Dependendo da sequência de aminoácidos do anticorpo do domínio constante de suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Há cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e vários destes podem ser adicionalmente divididos em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são

denominados alfa, delta, épsilon, gama, e mu, respetivamente. As estruturas das subunidades e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

"Fv" é um fragmento de anticorpo que contém um local de reconhecimento e de ligação antigénica completa. Numa espécie Fv de duas cadeias, esta região consiste num dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em firme associação não covalente. Numa espécie de Fv de cadeia única, um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve pode ser ligado de modo covalente por um ligante de péptido flexível tal que as cadeias leve e pesada podem se associar numa estrutura dimérica análoga à estrutura numa espécie de Fv de duas cadeias. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem que define uma especificidade de ligação de antigénio sobre a superfície do dímero VH-VL. No entanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv que compreende somente 3 CDRs específicas para um antigénio) tem a capacidade de reconhecer e ligar antigénio, embora geralmente numa menor afinidade do que o local de ligação inteiro.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Fragmentos Fab' diferem de fragmentos Fab pela adição de uns poucos resíduos no terminal carboxi do domínio CH1 de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas das regiões de articulação de anticorpo.

Um "anticorpo monoclonal" refere-se a uma população de anticorpos homogéneos em que o anticorpo monoclonal consiste em aminoácidos (naturais e não naturais) que estão envolvidos na ligação seletiva de um antigénio. Uma população de anticorpos monoclonais é altamente específica, sendo dirigida contra um único local antigénico. O termo "anticorpo monoclonal" abrange não somente anticorpos

monoclonais intactos como anticorpos monoclonais de extensão total, mas também fragmentos dos mesmos (tais como Fab, Fab¹, 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 compreende um local de reconhecimento antigénico da especificidade requerida e a capacidade de ligar-se a um antigénio. Não se pretende ser limitado com respeito à fonte do anticorpo ou à maneira na qual este é feito (por exemplo, por hibridoma, seleção de fago, expressão recombinante, animais transgénicos, e etc.).

Conforme usado no presente documento, "anticorpo humano" significa um anticorpo que tem uma sequência de aminoácidos correspondente à de um anticorpo produzido por um ser humano e/ou que tenha sido feito usando quaisquer das técnicas para preparar anticorpos humanos conhecidos na técnica ou descritos no presente documento. Esta definição de um anticorpo humano inclui anticorpos que compreendem pelo menos um polipéptido de cadeia pesada humano ou pelo menos um polipéptido de cadeia leve humano. Um exemplo semelhante é um anticorpo que compreende polipéptidos de cadeia leve murino e de cadeia pesada humano. Anticorpos humanos podem ser produzidos usando várias técnicas conhecidas na técnica. Numa forma de realização, o anticorpo humano é selecionado entre uma biblioteca de fagos, onde a biblioteca de fagos expressa anticorpos humanos (Vaughan *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets *et al.*, 1998, *PNAS*, (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom e Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Anticorpos humanos também podem ser produzidos por meio da introdução de loci de imunoglobulina humana em animais transgénicos, por exemplo, ratinhos nos quais os genes de imunoglobulina endógenos foram parcialmente ou completamente inativados.

Esta abordagem é descrita nas Patentes US N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; e 5.661.016. Alternativamente, o anticorpo humano pode ser preparado por meio da imortalização de linfócitos B humanos que produzem um anticorpo dirigido contra um antígeno alvo (os linfócitos B referidos podem ser recuperados de um indivíduo ou podem ter sido imunizados *in vitro*). Veja-se, por exemplo, Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; e a Patente US N° 5.750.373.

"Anticorpos quiméricos" refere-se aos anticorpos em que uma porção de cada uma das sequências de aminoácidos de cadeias pesada e leve é homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie em particular ou pertencente a uma classe em particular, ao passo que o segmento remanescente das cadeias é homólogo a sequências correspondentes em outra. Tipicamente, nestes anticorpos quiméricos, a região variável de ambas as cadeias leve e pesada simula as regiões variáveis de anticorpos derivados de uma espécie de mamíferos, enquanto as porções constantes são homólogas às sequências em anticorpos derivados de outra. Uma clara vantagem de semelhantes formas quiméricas é que, por exemplo, as regiões variáveis podem ser derivadas convenientemente de fontes atualmente conhecidas usando hibridomas prontamente disponíveis ou células B de organismos hospedeiros não humanos em combinação com regiões constantes derivadas de, por exemplo, preparações de células humanas. Enquanto a região variável tem a vantagem de facilidade de preparação, e a especificidade não é afetada por sua fonte, a região constante sendo humana, é menos provável de provocar uma reação imune de um indivíduo humano quando os anticorpos são injetados do que provocaria a região constante de uma fonte não humana. No entanto, a definição não está limitada a este exemplo em particular.

Uma "região Fc funcional" possui pelo menos uma função efetora de uma região Fc de sequência nativa. "Funções efetoras" típicas incluem ligação de Clq; citotoxicidade dependente do complemento (CDC); ligação de recetor de Fc; citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (CCDA); fagocitose; regulação negativa de recetores superficiais celulares (por exemplo, recetor de células B; BCR), etc. Tais funções efetoras referidas requerem geralmente que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (por exemplo, um domínio variável de anticorpo) e podem ser avaliadas usando vários ensaios conhecidos na técnica para avaliar tais funções efetoras de anticorpos.

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 a qual difere daquela de uma região Fc de sequência nativa em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido, mas retém pelo menos uma função efetora da região Fc de sequência nativa. Preferencialmente, a região Fc variante tem pelo menos uma substituição de aminoácido comparada com uma região Fc de sequência nativa ou com a região Fc de um polipéptido de origem, por exemplo, a partir de cerca de uma até cerca de dez substituições de aminoácidos, e preferencialmente a partir de cerca de uma até cerca de cinco substituições de aminoácidos numa região Fc de sequência nativa ou na região Fc do polipéptido de origem. A região Fc variante no presente documento, preferencialmente possuirá 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 de origem, e ainda mais preferencialmente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência com a mesma, mais preferencialmente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência com a mesma.

Conforme usado no presente documento "citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo" e "CCDA" referem-se a uma reação mediada por células na qual células citotóxicas não específicas que expressam recetores de Fc (FcRs) (por exemplo, células assassinas naturais (NK), neutrófilos, e macrófagos) reconhecem anticorpo ligado sobre uma célula alvo e em seguida causam lise da célula alvo. A atividade de CCDA de uma molécula de interesse pode ser avaliada usando um ensaio de CCDA *in vitro*, tal como as descritas na Patente US N° 5.500.362 ou 5.821.337. Células efectoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células NK. Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade de CCDA da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, num modelo animal tal como o descrito em Clynes *et al.*, 1998, PNAS (USA), 95:652-656.

Conforme usado no presente documento, "recetor de Fc" e "FcR" descrevem um recetor que liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferencial é um FcR humano de sequência nativa. Além disso, um FcR preferencial é um o qual se liga um anticorpo de IgG (um recetor gama) e inclui recetores das subclasses FcγRI, FcγRII, e FcγRNI, incluindo variantes alélicas e alternativamente formas unidas destes recetores. Recetores FcγRII incluem FcγRIIA (um "recetor de ativação") e FcγRIIB (um "recetor de inibição"), os quais têm sequências de aminoácidos semelhantes que diferem essencialmente nos domínios citoplasmáticos dos mesmos. FcRs são revisados em Ravetch e Kinet, 1991, Anrt. Rev. Immunol., 9:457-92; Capei *et al.*, 1994, Immunomethods, 4:25-34; e de Haas *et al.*, 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41. "FcR" também inclui o recetor neonatal, FcRn, o qual é responsável pela transferência de IgGs maternas para o feto (Guyer *et al.*, 1976, J. Immunol., 117:587; e Kim *et al.*, 1994, J. Immunol., 24:249).

"Citotoxicidade dependente do complemento" e "CDC"

referem-se à lise de um alvo na presença de complemento. A via de ativação do complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema do complemento (C1q) a uma molécula (por exemplo, um anticorpo) em complexo com um antigénio cognato. Para avaliar a ativação do complemento, pode ser realizada, por exemplo, um ensaio de CDC, conforme descrito em Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

Conforme usado no presente documento, os termos "E3", "3E", e "anticorpo E3" são usados de modo intercambiável para se referir a um anticorpo que compreende a sequência de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve mostrada nas Figuras 1A (SEQ ID NO: 1) e 1B (SEQ ID NO: 2), respetivamente. As porções CDR do anticorpo E3 (incluindo CDRs de Chothia e Kabat) são representadas de maneira diagramática nas Figuras 1A e 1B. As Figuras 2 e 3 mostram polinucleótidos que codificam cadeias pesadas e leves, respetivamente, que compreende as regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve mostradas nas Figuras 1A e 1B, respetivamente. A produção e caracterização de E3 são descritas nos Exemplos. Funções biológicas diferentes são associadas a E3, incluindo, mas não limitadas a, capacidade de ligar-se a NGF e inibir atividade biológica de NGF e/ou uma ou mais vias a jusante mediadas por sinalização de NGF; e capacidade de inibir a sobrevida dependente de NGF de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho. Conforme discutido no presente documento, os anticorpos da divulgação 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 de E3 que tem um número de depósito de ATCC N° PTA-4893 ou ATCC N° PTA-4894, e (b) um polinucleótido que codifica a cadeia pesada de E3 que tem um número de depósito de ATCC N° PTA-4895.

Conforme usado no presente documento, ligação

"imunoespecífica" de anticorpos refere-se à interação de ligação antigénio específica que ocorre entre o local de combinação de antigénio de um anticorpo e o antigénio específico reconhecido por aquele anticorpo (isto é, o anticorpo reage com a proteína num imunoensaio ELISA ou diverso, e não reage de modo detetável com proteínas não relacionadas).

Um epítopo que "se liga especificamente a", ou "se liga preferencialmente a" (usados de modo intercambiável no presente documento) a um anticorpo ou um polipéptido é um termo de conhecimento geral na técnica, e métodos para determinar tal ligação específica ou preferencial também são de conhecimento geral na técnica. Diz-se que uma molécula apresenta "ligação específica" ou "ligação preferencial" se reagir ou associar mais frequentemente, mais rapidamente, com maior duração e/ou com maior afinidade com uma célula ou substância em particular do que o faz com células ou substâncias alternativas. Um anticorpo "liga-se especificamente" ou "liga-se 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 se liga especificamente ou preferencialmente a um epítopo de NGF é um anticorpo que se liga a este epítopo com maior afinidade, avidéz, mais prontamente, e/ou com maior duração do que se liga a outros epítopos de NGF ou não epítopos de NGF. Também se entende pela leitura desta definição que, por exemplo, um anticorpo (ou porção ou epítopo) que se liga especificamente ou preferencialmente a um primeiro alvo pode ou não ligar especificamente ou preferencialmente a um segundo alvo. Deste modo, a "ligação específica" ou "ligação preferencial" não requer necessariamente (embora possa incluir) a ligação exclusiva. Geralmente, mas não necessariamente, referência a ligação significa ligação preferencial.

Os termos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" e "proteína" são usados de modo intercambiável no presente documento, para referir-se a polímeros de aminoácidos de qualquer extensão. O polímero pode ser linear ou ramificado, pode compreender aminoácidos modificados, e pode ser interrompido por não aminoácidos. Os termos também abrangem um polímero de aminoácidos que tenha sido modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo, formação de ligação dissulfureto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação, ou qualquer outra manipulação ou modificação, tal como conjugação com um componente de marcação. Também incluídos dentro da definição estão, por exemplo, polipéptidos contendo um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais, e etc.), bem como outras modificações conhecidas na técnica. Entende-se que, como os polipéptidos desta divulgação baseiam-se num anticorpo, os polipéptidos podem ocorrer como cadeias únicas ou cadeias associadas.

"Polinucleótido," ou "ácido nucleico," conforme usado de modo intercambiável no presente documento, referem-se a polímeros de nucleótidos de qualquer extensão, e incluem ADN e ARN. Os nucleótidos podem ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, bases ou nucleótidos modificados, e/ou seus análogos, ou qualquer substrato que pode ser incorporado num polímero por ADN ou ARN polimerase. Um polinucleótido pode compreender nucleótidos modificados, tais como nucleótidos metilados e seus análogos. Caso presente, a modificação da estrutura do nucleótido pode ser conferida antes ou depois de montagem do polímero. A sequência de nucleótidos pode ser interrompida por componentes não nucleótido. Um polinucleótido pode ser adicionalmente modificado depois de polimerização, tal como por conjugação com um componente de marcação. Outros tipos de modificações incluem, por exemplo, "caps", substituição de um ou mais dos nucleótidos que ocorrem naturalmente com

um análogo, modificações de internucleótidos tais como, por exemplo, as com ligações não carregadas (por exemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, e etc.) e com ligações carregadas (por exemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, e etc.), as ligações que contêm porções pendentes, tais como, por exemplo, proteínas (por exemplo, nucleases, toxinas, anticorpos, péptidos de sinalização, poly-L-lisina, e etc.), as ligações com intercaladores (por exemplo, acridina, psoraleno, e etc.), as ligações que contêm quelantes (por exemplo, metais, metais radioativos, boro, metais oxidativos, e etc.), as ligações que contêm alquiladores, aquelas com ligações modificadas (por exemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, e etc.), bem como formas não modificadas do um ou mais polinucleótidos. Além disso, quaisquer dos grupos oxidrilo ordinariamente presentes nos açúcares podem ser substituídos, por exemplo, por grupos fosfonatos, grupos fosfato, protegidos por grupos protetores de rotina, ou ativados para preparar ligações adicionais a nucleótidos adicionais, ou podem ser conjugadas a suportes sólidos. A OH 5' e 3' terminal pode ser fosforilada ou substituída com aminas ou porções de grupos de capeamento orgânico de a partir de 1 a 20 átomos de carbono. Outros oxidrilos também podem ser derivados para grupos protetores de rotina. Polinucleótidos também podem conter formas análogas de açúcares ribose ou desoxirribose que são conhecidos de modo geral na técnica, incluindo, por exemplo, 2'-O- metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro- ou 2'-azido-ribose, análogos de açúcares carbocíclicos, açúcares α -anoméricos, açúcares epiméricos tais como arabinose, xiloses ou lixoses, açúcares piranose, açúcares furanose, sedoheptuloses, análogos acíclicos e análogos de nucleósidos abásicos tais como metil ribosídeo. Uma ou mais ligações fosfodiéster podem ser substituídas por grupos de ligação alternativos. Estes grupos de ligação alternativos incluem, mas não estão limitados a, formas de

realização em que 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"), no qual cada R ou R' é de modo independente H ou alquilo (1-20 C) substituído ou não substituído opcionalmente contendo uma ligação éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo ou araldilo. Nem todas as ligações num polinucleótido precisam ser idênticas. A descrição precedente se aplica a todos os polinucleótidos referidos no presente documento, incluindo ARN e ADN.

Uma "região variável" de um anticorpo refere-se à região variável da cadeia leve de anticorpo ou à região variável da cadeia pesada de anticorpo, ou sozinha ou em combinação. As regiões variáveis da cadeia pesada e leve consistem, cada uma, em quatro regiões de estrutura (FR) conectadas por três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) também conhecidas como regiões hipervariáveis. As CDRs em cada cadeia são mantidas juntas em íntima proximidade pelos FRs e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação antigénica de anticorpos. Há pelo menos duas técnicas para determinar CDRs: (1) uma abordagem à base de variabilidade de sequência de espécies cruzadas (isto é, Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5^a ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); e (2) uma abordagem à base de 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 usado no presente documento, uma CDR pode ser referir a CDRs definidas por qualquer abordagem ou por uma combinação de ambas as abordagens.

Uma "região constante" de um anticorpo refere-se à região constante da cadeia leve de anticorpo ou à região constante da cadeia pesada de anticorpo, ou sozinha ou em combinação.

Conforme usado no presente documento, o termo "fator de crescimento dos nervos" e "NGF" refere-se a fator de crescimento dos nervos e variantes do mesmo que conservam pelo menos parte da atividade biológica do NGF. Conforme usado no presente documento, NGF inclui todas as espécies mamíferas de NGF de sequência nativa, incluindo humana, canina, felina, equina, ou bovina.

"Recetor de NGF" refere-se a um polipéptido que é ligado por ou ativado por NGF. Recetores de NGF incluem o recetor TrkA e o recetor p75 de quaisquer espécies mamíferas, incluindo, mas não limitadas a, humana, canina, felina, equina, primata, ou bovina.

Conforme usado no presente documento, um "anticorpo antagonista anti-NGF" (de modo intercambiável denominado "anticorpo anti-NGF") refere-se a um anticorpo o qual é capaz de ligar a NGF e inibir a atividade biológica do NGF e/ou uma ou mais vias a jusante mediadas por sinalização de NGF. Um anticorpo antagonista anti-NGF abrange anticorpos que bloqueiam, antagonizam, suprimem ou reduzem (incluindo significativamente) a atividade biológica do NGF, incluindo vias a jusante mediados por sinalização de NGF, tais como ligação de recetor e/ou provocação de uma reação celular a NGF. Para os fins da presente divulgação, será explicitamente entendido que o termo "anticorpo antagonista anti-NGF" abrange todos os termos, títulos, e estados funcionais e características previamente identificados por meio dos quais o próprio NGF, uma biológica atividade de NGF (incluindo, mas não limitada a sua capacidade de capacidade de mediar qualquer aspeto de dor pós-cirúrgica), ou as consequências da atividade biológica, são substancialmente anulados, reduzidos, ou neutralizados em qualquer grau significativo. Em algumas formas de realização, um anticorpo antagonista anti-NGF liga NGF e evita a dimerização de NGF e/ou ligação a um recetor de NGF (tal como p75 e/ou trkA). Em outras formas de realização,

um anticorpo anti- NGF liga NGF e evita a dimerização de recetor trkA e/ou autofosforilação de trkA. Exemplos de anticorpos antagonistas anti-NGF são proporcionados no presente documento.

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

Conforme usado no presente documento, "substancialmente puro" refere-se a material o qual é pelo menos 50% puro (isto é, livre de contaminantes), 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 celular que pode ser ou tenha sido um recetor para um ou mais vetores para incorporação de insertos de polinucleótidos. Células hospedeiras incluem progénie de uma única célula hospedeira, e a progénie pode não ser necessariamente completamente idêntica (em morfologia ou em complemento de ADN genómico) à célula original matriz

devido a mutação natural, acidental, ou deliberada. Uma célula hospedeira inclui células transfetadas *in vivo* com um ou mais polinucleótidos desta divulgação.

Conforme usado no presente documento, "tratamento" é uma abordagem para obter resultados clínicos benéficos ou desejados. Para os fins desta divulgação, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados a, um ou mais dos seguintes: melhora ou alívio de qualquer aspecto de dor, incluindo dor aguda, crônica, inflamatória, neuropática, dor pós-cirúrgica, dor da artrite reumatoide, ou dor da osteoartrite. Para os fins desta divulgação, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados a, um ou mais dos seguintes: incluindo a redução da gravidade, alívio de um ou mais sintomas associados com dor incluindo qualquer aspecto de dor (tal como encurtamento da duração da dor, redução da sensibilidade ou sensação de dor).

Uma "quantidade eficaz" de fármaco, composto, ou composição farmacêutica é uma quantidade suficiente para efetuar resultados benéficos ou desejados incluindo resultados clínicos tais como alívio ou redução na sensação da dor. Uma quantidade eficaz pode ser administrada numa ou mais administrações. Para os fins desta divulgação, uma quantidade eficaz de fármaco, composto, ou composição farmacêutica é uma quantidade suficiente para tratar, melhorar, reduzir a intensidade de e/ou prevenir dor, incluindo dor pós-cirúrgica, dor da artrite reumatoide, e/ou dor da osteoartrite. Em algumas formas de realização, a "quantidade eficaz" pode reduzir dor em repouso (dor estacionária) ou dor induzida mecanicamente (incluindo dor depois de movimento), ou ambos, e pode ser administrada antes, durante ou depois de uma incisão, corte, rasgo ou lesão e/ou antes, durante ou depois de estímulo doloroso. Conforme é entendido no contexto clínico, uma quantidade eficaz de um fármaco, composto, ou composição farmacêutica

pode ou não ser obtida em combinação com outro fármaco, composto, ou composição farmacêutica. Portanto, uma "quantidade eficaz" pode ser considerada no contexto de administrar um ou mais agentes terapêuticos, e um único agente pode ser considerado para ser administrado numa quantidade eficaz caso, em combinação com um ou mais agentes diversos, possa ser obtido, ou seja obtido um resultado desejável.

"Reduzir a incidência" de dor significa qualquer um entre reduzir a gravidade (que pode incluir reduzir a necessidade de e/ou quantidade de (por exemplo, exposição a) outros fármacos e/ou terapias usados de modo geral para estas condições, incluindo, por exemplo, opiáceos), duração, e/ou frequência (incluindo, por exemplo, retardar ou aumentar o tempo para dor pós-cirúrgica num indivíduo). Conforme é entendido pelos peritos na especialidade, os indivíduos podem variar em termos de sua reação ao tratamento, e, deste modo, por exemplo, um "método para reduzir a incidência de dor da artrite reumatoide ou dor da osteoartrite num indivíduo" reflete administrar o anticorpo antagonista anti-NGF com base numa expectativa razoável de que tal administração pode causar provavelmente uma redução semelhante na incidência naquele indivíduo em particular.

"Melhorar" uma dor ou um ou mais sintomas de uma dor (tal como dor da artrite reumatoide ou dor da osteoartrite) significa uma redução ou melhora de um ou mais sintomas de uma dor comparada com não administração de um anticorpo antagonista anti-NGF. "Melhorar" também inclui encurtamento ou redução na duração de um sintoma.

"Aliviar" uma dor ou um ou mais sintomas de uma dor (tal como dor da artrite reumatoide ou dor da osteoartrite) significa reduzir a extensão de uma ou mais manifestações clínicas indesejáveis de dor pós-cirúrgica num indivíduo ou população de indivíduos tratados com um anticorpo antagonista anti-NGF de acordo com a divulgação.

Conforme usado na mesma, "retardar" o desenvolvimento de dor significa adiar, impedir, tornar mais lenta, retardar, estabilizar, e/ou postergar a progressão da dor, tal como dor pós-cirúrgica, dor da artrite reumatoide, ou dor da osteoartrite. Este atraso pode ser de extensões de tempo variáveis, dependendo do histórico da doença e/ou indivíduos sendo tratados. Conforme é evidente para um perito na especialidade, um atraso suficiente ou significativo pode, em efeito, englobar prevenção, em que o indivíduo não desenvolve dor. Um método que "atrasa" o desenvolvimento do sintoma é um método que reduz a probabilidade de desenvolver o sintoma numa dada janela de tempo e/ou reduz a extensão dos sintomas numa dada janela de tempo, quando comparado a não usar o método. As comparações referidas tipicamente se baseiam em estudos clínicos, usando um número estatisticamente significativo de indivíduos.

"Dor" conforme usado no presente documento, refere-se a dor de qualquer etiologia, incluindo dor aguda e crónica, e qualquer dor com um componente inflamatório. Exemplos de dor incluem dor pós-cirúrgica, dor do pós-operatório (incluindo dor dental), enxaqueca, cefaleia e nevralgia trigeminal, dor associada a queimadura, ferimento ou pedra renal, dor associada a trauma (incluindo lesão traumática da 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 peri-articulares, e dor associada a cancro (incluindo "dor de rutura" e dor associada a cancro terminal), neuropatia periférica e nevralgia pós-herpética. Exemplos de dor com um componente inflamatório (além de algumas das descritas acima) incluem dor reumática, dor associada a mucosite, e dismenorrea.

"Dor pós-cirúrgica" (denominada de modo intercambiável

"dor pós-incisional" ou "dor pós-traumática") refere-se a dor originária ou resultante de um trauma externo tal como um corte, punção, incisão, dilaceramento, ou ferimento em tecido de um indivíduo (incluindo a que surge de todos os procedimentos cirúrgicos, quer invasiva ou não invasiva). Conforme usado no presente documento, dor pós-cirúrgica não inclui dor que ocorre (surge ou se origina) sem um trauma físico externo. Em algumas formas de realização, dor pós-cirúrgica é dor interna ou externa (incluindo periférica), e o ferimento, corte, trauma, dilaceramento ou incisão pode ocorrer acidentalmente (como com um ferimento traumático) ou deliberadamente (como com uma incisão cirúrgica). Conforme usado no presente documento, "dor" inclui nociceção e a sensação de dor, e a dor pode ser avaliada objetivamente e subjetivamente, usando pontuações de dor e outros métodos de conhecimento geral na técnica. Dor pós-cirúrgica, conforme usado no presente documento, inclui alodinia (isto é, aumento da reação a um estímulo normalmente não nocivo) e hiperalgesia (isto é, aumento da reação a um estímulo normalmente nocivo ou desagradável), que por sua vez, pode ser de natureza térmica ou mecânica (táctil). 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. Em outras formas de realização, a dor pós-cirúrgica compreende dor em repouso. A dor pode ser dor primária ou secundária, conforme é de conhecimento geral na técnica.

Uma "amostra biológica" abrange uma variedade de tipos de amostras obtidas de um indivíduo e pode ser usada num ensaio de diagnóstico ou de monitorização. A definição abrange amostras de sangue e outros líquidos de origem biológica, amostras de tecidos sólidos tais como uma amostra de biopsia ou culturas de tecidos ou células

derivadas dos mesmos, e a progénie dos mesmos. A definição também inclui amostras que foram manipuladas em qualquer modo depois de sua aquisição, tal como por tratamento com reagentes, solubilização, ou enriquecimento para alguns componentes, tais como proteínas ou polinucleótidos, ou embutindo numa matriz sólida ou semissólida para fins de seccionamento. O termo "amostra biológica" abrange uma amostra clínica, também inclui células em cultura, sobrenadantes celulares, lisados celulares, soro, plasma, fluido biológico, e amostras de tecido.

Um "indivíduo" é um vertebrado, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um ser humano. Mamíferos incluem, mas não estão limitados a, animais de criação (tais como vacas), animais de competição, animais de estimação (tais como gatos, cães e cavalos), primatas, ratinhos e ratos.

Conforme usado no presente documento, "vetor" significa uma construção, o qual é capaz de libertar, e preferencialmente expressar, um ou mais genes ou uma ou mais sequências de interesse numa célula hospedeira. Exemplos de vetores incluem, mas não estão limitados a, vetores virais, vetores de expressão de ARN ou ADN nu, plasmídeo, vetores de cosmídeo ou fago, vetores de expressão de ADN ou ARN associados a agentes de condensação catiónicos, vetores de expressão de ADN ou ARN encapsulados em lipossomas, e algumas células eucarióticas, tais como células produtoras.

Conforme usado no presente documento, "sequência de controlo de expressão" significa uma sequência de ácido nucleico que orienta a transcrição de um ácido nucleico. Uma sequência de controlo de expressão pode ser um promotor, tal como um promotor constitutivo ou um indutível, ou um intensificador. A sequência de controlo de expressão é ligada operativamente à sequência de ácido nucleico a ser transcrita.

Conforme usado no presente documento, "veículo farmacologicamente aceitável" inclui qualquer material o qual, quando combinado com um ingrediente ativo, permite que o ingrediente conserve a atividade biológica e seja não reativo com o sistema imunitário do indivíduo. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, quaisquer dos veículos farmacêuticos de padrão tais como uma solução salina tamponada com fosfato, água, emulsões tais como emulsão de óleo / água, e vários tipos de agentes humectantes. Diluentes preferenciais para administração aerossol ou parentérica são solução salina tamponada com fosfato ou solução salina normal (0,9%). Composições que compreendem os veículos referidos são formuladas por métodos convencionais de conhecimento geral (veja-se, 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 usado no presente documento, pretende referir-se à constante de taxa de dissociação para dissociação de um anticorpo do complexo antigénio/anticorpo.

O termo " K_d ", conforme usado no presente documento, pretende referir-se à constante de dissociação de uma interação antigénio/anticorpo.

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

Composições de E3, Composições Derivadas de E3, e Métodos para Preparar as Composições

Esta invenção abrange composições, incluindo composições farmacêuticas, que compreende um anticorpo de E3. Conforme usado no presente documento, as composições compreendem um ou mais anticorpos que se ligam a NGF. Estas composições podem compreender adicionalmente excipientes adequados, tais como excipientes farmacologicamente

aceitáveis incluindo tampões, os quais são de conhecimento geral na técnica.

A divulgação também abrange formas de realização de anticorpo, polipéptido e polinucleótido isolados. A divulgação também abrange formas de realização de anticorpo, polipéptido e polinucleótido substancialmente puros.

Os anticorpos para utilização na invenção são caracterizados por qualquer uma (ou mais) das seguintes características: (a) capacidade de ligar-se a NGF; (b) capacidade de reduzir e/ou inibir a atividade biológica de NGF e/ou uma ou mais vias a jusante mediadas por 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 a NT3, NT4/5, e/ou BDNF; (e) capacidade de tratar e/ou prevenir dor (incluindo dor pós-cirúrgica); (f) capacidade de aumentar a depuração de NGF; (g) capacidade de reduzir ou inibir a ativação de recetor de trkA, conforme detetado, por exemplo, usando ensaio de ativação de recetor de quinase (KIRA) (veja-se a Patente US N° 6.027.927).

As propriedades de ligação do anticorpo E3, o qual se liga a NGF humano com alta afinidade e cinética de dissociação lenta, comparado com anticorpo anti-NGF monoclonal murino de origem 911, são resumidas abaixo. E3 liga NGF humano com uma afinidade de ligação cerca de 50 vezes maior do que o anticorpo de ratinho de origem 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 também apresentam uma forte capacidade de antagonizar NGF humano, conforme avaliado por ensaios *in vitro* (veja-se os Exemplos

2 e 3). Por exemplo, o anticorpo E3 antagoniza a sobrevivência dependente de NGF de neurónios trigeminais E13 de ratinho numa CI50 de cerca de 21 pM na presença de 15 pM de NGF humano, e cerca de 1,2 pM na presença de 1,5 pM de NGF humano.

Por conseguinte, em outro aspeto, os anticorpos para utilização na invenção são adicionalmente identificados e caracterizados por: (h) alta afinidade de ligação a 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 uma CI50 de cerca de 100 pM ou menos a cerca de 15 pM de NGF (em algumas formas de realização, NGF humano) e/ou uma CI50 de cerca de 20 pM ou menos a cerca de 1,5 pM de NGF.

Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a NGF humano, e não se liga significativamente a um NGF de outra espécie de vertebrado (em alguma forma de realização, mamífero). Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a NGF humano bem como um ou mais NGF de outra espécie de vertebrado (em algumas formas de realização, mamífero). Em ainda outras formas de realização, o anticorpo liga-se a NGF e não tem reação cruzada significativamente com outras neurotrofinas (tais como as neurotrofinas relacionadas, NT3, NT4/5, e/ou BDNF). Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a NGF bem como pelo menos uma outra neurotrofina. Em algumas formas de realização, o anticorpo liga a uma espécie mamífera de NGF, tal como cavalo ou cachorro, mas não se liga significativamente a NGF de outra espécie mamífera.

Em algumas formas de realização, o anticorpo para utilização na invenção compreende uma cadeia leve que é codificada por um polinucleótido que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N° PTA-

4893 ou ATCC N° PTA-4894. Em outro aspeto, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleótido que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC N° PTA-4895. A presente invenção também abrange várias formulações de E3 e fragmentos de anticorpos equivalentes (por exemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), cadeia única (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão que compreendem uma porção de anticorpo, e qualquer outra configuração modificada de E3 que compreende um local de reconhecimento antigénico (NGF) da especificidade requerida. Os anticorpos equivalentes de E3, incluindo fragmentos de anticorpos e de polipéptidos (os quais podem ser ou não anticorpos) de E3, e polipéptidos que compreendem fragmentos de polipéptidos de E3 são identificados e caracterizados por quaisquer (um ou mais) dos critérios descritos acima.

Por conseguinte, a invenção proporciona quaisquer dos seguintes, ou composições (incluindo composições farmacêuticas) que compreende quaisquer dos seguintes: (a) anticorpo E3; (b) um fragmento ou uma região do anticorpo E3; (c) uma cadeia leve do anticorpo E3 conforme mostrado nas Figuras 1B; (c) uma cadeia pesada do anticorpo E3 conforme mostrado nas Figuras 1A; (d) uma ou mais regiões variáveis de uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada do anticorpo E3; (e) uma ou mais CDRs (uma, duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs) do anticorpo E3 mostradas nas Figuras 1A e 1B; (f) CDR H3 da cadeia pesada do anticorpo E3 mostrada na figura 1A; (g) CDR L3 da cadeia leve do anticorpo E3 mostrada na Figura 1B; (h) três CDRs da cadeia leve do anticorpo E3 mostrada na Figura 1B; (i) três CDRs da cadeia pesada do anticorpo E3 mostrada na Figura 1A; (j) três CDRs da cadeia leve e três CDRs da cadeia pesada, do anticorpo E3 mostrada nas Figuras 1A e 1B; e (k) um anticorpo que compreende qualquer um de (b) a (j). Conforme é evidente a partir da descrição no presente documento,

especificamente excluídas da invenção estão formas de realização de polipéptidos consistindo na sequência de aminoácidos idêntica a uma sequência de aminoácidos de anticorpo monoclonal de ratinho, 911. As sequências de CDR estendidas de Mab 911 são mostradas nas Figuras 1A e 1B, e na SEQ ID NOS: 9-14.

As porções CDR do anticorpo E3 (incluindo CDRs de Chothia e Kabat) são representadas de maneira diagramática nas Figuras 1A e 1B, e consistem nas seguintes sequências de aminoácidos: (a) CDR 1 de cadeia pesada ("CDR H1") GFSLIGYDLN (SEQ ID NO: 3); (b) CDR 2 de cadeia pesada ("CDR H2") IIWGDGTTDYN SAVKS (SEQ ID NO: 4); (c) CDR 3 de cadeia pesada ("CDR H3") GGYWYATSY YFDY (SEQ ID NO: 5); (d) CDR 1 de cadeia leve ("CDR L1") RASQSI SNNLN (SEQ ID NO: 6); (e) CDR 2 de cadeia leve ("CDR L2") YTSRFHS (SEQ ID NO: 7); e (f) CDR 3 de cadeia leve ("CDR L3") QQEHTLPYT (SEQ ID NO: 8). A determinação de regiões de CDR está bem dentro do conhecimento da técnica. É entendido que em algumas formas de realização, as CDRs podem ser uma combinação da CDR de Kabat e Chothia (também denominadas "CDRs combinadas" ou "CDRs estendidas"). Em algumas formas de realização, as CDRs compreendem a CDR de Kabat. Em outras formas de realização, as CDRs são a CDR de Chothia.

Em algumas formas de realização, a invenção proporciona um anticorpo o qual compreende pelo menos uma CDR que é substancialmente homóloga a pelo menos uma CDR, pelo menos duas, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos 5 CDRs de E3 (ou, em algumas formas de realização substancialmente homóloga a todas as 6 CDRs de E3, ou derivados de E3). Outras formas de realização incluem anticorpos os quais têm pelo menos duas, três, quatro, cinco, ou seis CDR(s) que são substancialmente homólogas a pelo menos duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs de E3 ou derivados de E3. Entende-se que, para os fins desta invenção, especificidade de ligação e/ou atividade global

(a qual pode ser em termos de tratar e/ou prevenir dor ou inibir a sobrevida dependente de NGF de neurónios trigeminais de ratinho E13.5) é geralmente conservada, embora a extensão da atividade possa variar comparada com E3 (pode ser maior ou menor).

A invenção também proporciona um anticorpo o qual compreende uma sequência de aminoácidos de E3 (mostrada nas Figuras 1A e 1B) que tem quaisquer 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 pelo menos 3 dos aminoácidos são de uma região variável de E3, com o entendimento de que formas de realização que consistem na sequência de aminoácidos idêntica a uma sequência de aminoácidos de anticorpo monoclonal de ratinho, 911, são especificamente excluídas. As sequências de CDR estendidas de Mab 911 são mostradas nas Figuras 1A e 1B, e nas SEQ ID NOS: 9-14. Numa forma de realização, a região variável é de uma cadeia leve de E3. Em outra forma de realização, a região variável é de uma cadeia pesada de E3. Em outra forma de realização, os 5 (ou mais) aminoácidos contíguos são de uma região determinante de complementaridade (CDR) de E3 mostrada nas Figuras 1A e 1B.

Em outra forma de realização, a invenção proporciona um polipéptido o qual compreende uma sequência de aminoácidos de E3 que tem quaisquer 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 de: 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 entendimento de que formas de realização que consistem na sequência de aminoácidos idêntica a uma sequência de aminoácidos de anticorpo monoclonal de ratinho, 911, são especificamente excluídas.

Conforme é evidente, do início ao fim desta descoberta, é usado um esquema de numeração sequencial de aminoácidos para referir a resíduos aminoácidos nas regiões variáveis (isto é, os resíduos aminoácidos em cada região variável são numerados em sequência). Conforme é de conhecimento geral na técnica, os sistemas de numeração Kabat e/ou Chothia são úteis ao comparar dois anticorpos ou polipéptidos, tais como um anticorpo E3 e uma variante de E3 (ou polipéptido suspeito de ser uma variante de E3). É de entendimento geral na técnica como converter numeração sequencial para numeração Chothia e/ou Kabat, caso desejado, por exemplo, para utilização para fazer comparações entre E3 e outro polipéptido. A Figura 23 representa as regiões variáveis E3 numeradas usando numeração sequencial, Chothia e Kabat. Além disso, para facilitar a comparação, geralmente se entende que resíduos de estrutura geralmente, mas não sempre, têm aproximadamente o mesmo número de resíduos. No entanto, as CDRs podem variar de tamanho (isto é, é possível ter inserções e/ou eliminações de um ou mais resíduos aminoácidos). Ao comparar um anticorpo de E3 e um candidato variante de E3 (por exemplo, no caso de uma região CDR de uma sequência candidata a qual é mais longa na sequência no anticorpo E3 ao qual está alinhada), pode-se seguir as seguintes etapas (embora outros métodos sejam conhecidos na técnica). A sequência de anticorpos candidata é alinhada com regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve de

anticorpo E3. O alinhamento pode ser feito manualmente, ou por computador usando programas de computador comumente aceitos. O alinhamento pode ser facilitado usando alguns resíduos aminoácidos os quais são comuns às maiorias das sequências Fab. Por exemplo, as cadeias leve e pesada tipicamente têm cada duas cisteínas, as quais são encontradas numa posição conservada. Entende-se que a sequência de aminoácidos de um anticorpo variante candidato pode ser mais longa (isto é, ter resíduos aminoácidos inseridos) ou mais curta (ter resíduos aminoácidos eliminados). Sufixos podem ser adicionados ao número do resíduo para indicar a inserção de resíduos adicionais, por exemplo, resíduo 34 abc. Para sequências candidatas as quais, por exemplo, alinham com uma sequência de E3 para, por exemplo, resíduos 33 e 35, mas não têm nenhum resíduo entre estes para alinhar com o resíduo 35, o resíduo 35 é simplesmente não atribuído a um resíduo. Em outra abordagem, geralmente é de conhecimento geral que pode ser feita comparação entre aminoácidos equivalentes estruturais (por exemplo, mesma posição no complexo antigénio-anticorpo) ao comparar CDRs de diferentes extensões. Por exemplo, a numeração Chothia (Al-Lazikani *et al.*, mencionado acima) geralmente (mas não em todos os casos), coloca inserções e eliminações nas posições estruturalmente corretas. A equivalência estrutural também pode ser deduzida ou demonstrada usando cristalografia de raios X ou análise de ciclo mutante duplo (veja-se Pons *et al.* (1999) *Prot. Sci.* 8:958- 968).

A afinidade de ligação de um anticorpo anti-NGF a NGF (tal como hNGF) pode ser cerca de 0,10 até cerca de 0,80 nM, cerca de 0,15 até cerca de 0,75 nM e cerca de 0,18 até cerca de 0,72 nM. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é 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 mais de cerca de 40 pM. Numa forma de realização, a

afinidade de ligação é entre cerca de 2 pM e 22 pM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é menos de cerca de 10 nM, cerca de 5 nM, cerca de 4 nM, cerca de 3,5 nM, cerca de 3 nM, cerca de 2,5 nM, 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. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é cerca de 10 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é menos de cerca de 10 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é cerca de 0,1 nM ou cerca de 0,07 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é menos de cerca de 0,1 nM ou menos de cerca de 0,07 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é qualquer de cerca de 10 nM, cerca de 5 nM, cerca de 4 nM, cerca de 3,5 nM, cerca de 3 nM, cerca de 2,5 nM, 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 to qualquer 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 de cerca de 10 nM, cerca de 5 nM, cerca de 4 nM, cerca de 3,5 nM, cerca de 3 nM, cerca de 2,5 nM, 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. Em ainda outras formas de realização, a afinidade de ligação é 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 mais de cerca de 40 pM.

A afinidade de ligação do anticorpo a NGF pode ser determinada usando métodos de conhecimento geral na técnica. Um modo para determinar a afinidade de ligação dos anticorpos a 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 expresso de modo recombinante. A afinidade de um fragmento Fab anti-NGF de um anticorpo pode ser determinada por ressonância de plasmão superficial (sistema de ressonância de plasmão superficial BIAcore3000™ (SPR), BIAcore, INC, Piscataway NJ), conforme descrito nos Exemplos. Este protocolo é adequado para utilização na determinação da afinidade de ligação de um anticorpo a 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 para utilização na invenção podem inibir (reduzir, e/ou bloquear) a sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer 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 para utilização na invenção podem inibir (reduzir, e/ou bloquear) a sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI50 (na presença de cerca de 1,5 pM de NGF) de cerca de qualquer 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 para utilização na invenção podem inibir (reduzir, e/ou bloquear) a sobrevivência dependente de NGF de rato de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer 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 podem inibir (reduzir, e/ou bloquear) a sobrevivência dependente de NGF de rato de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho com uma CI50 (na presença de cerca de 1,5 pM de NGF) de cerca de qualquer de 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM, ou menos. Métodos para medição da sobrevivência dependente de NGF de neurónios trigeminais E13 de ratinho são conhecidos na técnica, e descritos, por exemplo, no Exemplo 2.

A divulgação também proporciona métodos para preparar quaisquer destes anticorpos ou polipéptidos. Os anticorpos podem ser preparados por procedimentos conhecidos na técnica, alguns dos quais são ilustrados nos Exemplos. Os polipéptidos podem ser produzidos por degradação proteolítica ou diversa dos anticorpos, por métodos recombinantes (isto é, polipéptidos únicos ou de fusão) conforme descrito acima ou por síntese química. Polipéptidos dos anticorpos, especialmente polipéptidos mais curtos até cerca de 50 aminoácidos, são preparados convenientemente por síntese química. 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 empregando o método de fase sólida. Veja-se também, as Patentes US N° 5.807.715; 4.816.567; e 6.331.415. Anticorpos quiméricos ou híbridos também podem ser preparados *in vitro* usando métodos conhecidos de química de proteínas sintéticas, incluindo aqueles envolvendo agentes de reticulação. Por exemplo, imunotoxinas podem ser

construídas usando uma reação de permuta dissulfeto ou formando uma ligação tioéter. Exemplos de reagentes adequados para este fim incluem iminotiolato e metil-4-mercaptoputirimidato.

Em outra alternativa, os anticorpos podem ser preparados de modo recombinante usando procedimentos que são de conhecimento geral na técnica. Numa forma de realização, um polinucleótido que compreende uma sequência que codifica as regiões de cadeia leve e variável do anticorpo E3 (mostradas nas Figuras 1A e 1B) é clonado num vetor para expressão ou propagação numa célula hospedeira (por exemplo, células CHO). Em outra forma de realização, as sequências de polinucleótidos mostradas 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 futuro. Vetores (incluindo vetores de expressão) e células hospedeiras são adicionalmente descritos no presente documento. Foram descritos métodos para expressar anticorpos de modo recombinante em plantas ou leite. Veja-se, 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. São conhecidos na técnica métodos para preparar derivados de anticorpos, por exemplo, humanizados, de cadeia única, e etc.

A invenção também abrange fragmentos de região variável de cadeia única ("scFv") de anticorpos desta invenção, tais como E3. Fragmentos de região variável de cadeia única são preparados encadeando regiões variáveis de cadeia leve e/ou pesada usando um péptido de ligação curto. Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426. Um exemplo de um péptido de ligação é (GGGS)₃ (SEQ ID NO: 15), o qual constrói ponte de cerca de 3,5 nm entre o terminal carboxi

de uma região variável e o terminal amino da outra região variável. Ligantes de outras sequências foram designados e usados (Bird *et al.* (1988)). Ligantes podem ser por sua vez modificados para funções adicionais, tais como fixação de fármacos ou fixação a suportes sólidos. As variantes de cadeia única podem ser produzidas ou de modo recombinante ou sinteticamente. Para produção sintética de scFv, pode ser usado um sintetizador automático. Para produção recombinante de scFv, pode ser introduzido um plasmídeo adequado contendo polinucleótido que codificam o scFv numa célula hospedeira adequada, quer eucariótica, tal como células de levedura, vegetal, de inseto ou de mamífero, quer procariótica, tal como *E. coli*. Polinucleótidos que codificam o scFv de interesse podem ser preparados por manipulações de rotina tais como ligação de polinucleótidos. O scFv resultante pode ser isolado usando técnicas de purificação de proteína de rotina conhecidas na especialidade.

Outras formas de anticorpos de cadeia única, tais como diacorpos também são englobadas. Diacorpos são anticorpos bivalentes, biespecíficos nos quais os domínios VH e VL são expressos sobre uma cadeia única de polipéptido, mas usando um ligante que é curto demais para permitir emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia, deste modo forçando os domínios a emparelhar com domínios complementares de outra cadeia e criando dois locais de ligação antigénica (veja-se, por exemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., *et al.* (1994) Structure 2:1121-1123).

O anticorpo pode ser um anticorpo biespecífico, um anticorpo monoclonal que tem especificidades de ligação para pelo menos dois antigénios diferentes. Um anticorpo biespecífico pode ser preparado usando os anticorpos descritos no presente documento. São conhecidos na técnica métodos para preparar anticorpos biespecíficos (veja-se,

por exemplo, Suresh *et al.*, 1986, *Methods in Enzymology* 121:210). Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos baseou-se na coexpressão de dois pares de cadeias pesada-leve de imunoglobulina, com as duas cadeias pesadas tendo diferentes especificidades (Millstein e Cuello, 1983, *Nature* 305, 537-539).

De acordo com uma abordagem para preparar anticorpos biespecíficos, domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação antigénio-anticorpo) são fusionados a sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão preferencialmente é com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende pelo menos parte da articulação, regiões CH2 e CH3. É preferencial ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1), contendo o local necessário para ligação de cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. ADN que codifica as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, caso desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão isolados, e são cotransfetados num organismo hospedeiro adequado. Isto proporciona grande flexibilidade em ajustar as proporções mútuas dos três fragmentos de polipéptidos em formas de realização quando proporções desiguais das três cadeias de polipéptidos usadas na construção proporcionam as produções ótimas. No entanto, é possível inserir as sequências codificantes para duas ou todas as três cadeias de polipéptidos num vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias de polipéptidos em iguais proporções resulta em altas produções ou quando as proporções não são de importância particular.

Numa abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de 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

(proporcionando uma segunda especificidade de ligação) em outro braço. Esta estrutura assimétrica, com uma cadeia leve de imunoglobulina em somente metade da molécula biespecífica, facilita a separação do composto biespecífico desejado de combinações de cadeias de imunoglobulina indesejadas. Esta abordagem é descrita na Publicação de Patente Internacional PCT N° WO 94/04690, publicada em 3 de Março de 1994.

Anticorpos heteroconjugados, que compreendem dois anticorpos ligados de modo covalente, também estão dentro do âmbito da invenção. Os anticorpos referidos têm sido usados para ter por alvo células do sistema imunitário para células indesejadas (Patente US N° 4.676.980), e para tratamento de infecção por VIH (publicação do pedido de patente PCT N° WO 91/00360 e WO 92/200373; EP 03089). Anticorpos heteroconjugados podem ser preparados usando quaisquer métodos de reticulação convenientes. Agentes e técnicas de reticulação adequados são de conhecimento geral na técnica, e são descritos na Patente US N° 4.676.980.

O anticorpo pode ser um anticorpo humanizado, por exemplo, conforme conhecido na técnica, e conforme descrito no presente documento.

Anticorpos podem ser modificados conforme descrito na Publicação de Patente Internacional PCT N° WO 99/58572, publicada em 18 de Novembro de 1999. Estes anticorpos compreendem, além de um domínio de ligação dirigido na molécula alvo, um domínio efetor tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente homóloga ao todo ou parte de um domínio constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina humana. Estes anticorpos são capazes de ligar a molécula alvo sem iniciar um processo de lise dependente de complemento significativo, ou destruição, mediada por células, do alvo. Preferencialmente, o domínio efetor é capaz de ligar especificamente FcRn e/ou FcγRIIb. Estes são tipicamente à base de domínios quiméricos derivados de dois

ou mais domínios CH₂ de cadeia pesada de imunoglobulina humana. Anticorpos modificados nesta maneira são preferenciais para utilização em terapêutica crónica com anticorpos, para evitar reações adversas inflamatórias e diversas a terapêutica com anticorpo convencional.

A invenção abrange modificações para o anticorpo E3, incluindo anticorpos funcionalmente equivalentes os quais não afetam significativamente suas propriedades e variantes as quais têm atividade aumentada ou reduzida. A modificação de polipéptidos é prática de rotina na técnica e é adicionalmente exemplificada nos Exemplos. Exemplos de polipéptidos modificados incluem polipéptidos com substituições (incluindo substituições conservativas) de resíduos aminoácidos, uma ou mais eliminações ou adições de aminoácidos as quais não alteram prejudicialmente de modo significativo a atividade funcional, ou utilização de análogos químicos.

Um polipéptido "variante," conforme usado no presente documento, é um polipéptido que difere de uma proteína nativa numa ou mais substituições, eliminações, adições e/ou inserções, de tal modo que a imunorreatividade do polipéptido não seja substancialmente diminuída. Em outras palavras, a capacidade de uma variante para ligar antigénio especificamente pode ser reforçada ou inalterada, em relação à proteína nativa, ou pode ser diminuída por menos de 50%, e preferencialmente menos de 20%, em relação à proteína nativa. Polipéptidos variantes preferencialmente apresentam pelo menos cerca de 80%, mais preferencialmente pelo menos cerca de 90% e ainda mais preferencialmente pelo menos cerca de 95% de identidade (determinada conforme descrito no presente documento) com os polipéptidos identificados.

Variantes de sequências de aminoácidos dos anticorpos podem ser preparadas introduzindo alterações de nucleótidos apropriadas no ADN do anticorpo, ou por síntese de péptido.

Tais variantes incluem, por exemplo, eliminações de, e/ou inserções em e/ou substituições de, resíduos dentro das sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ou 2 descritas no presente documento. Qualquer combinação de eliminação, inserção, e substituição é feita para chegar à construção final, contanto que a construção final possua as características desejadas. As alterações de aminoácidos também podem alterar processos pós-traducionais do anticorpo, tais como alterar o número ou a posição de locais de glicosilação.

Um método útil para identificação de alguns resíduos ou regiões do anticorpo que são localizações preferenciais para mutagênese ou modificação é denominado "mutagênese de varrimento de alanina," e é descrito por Cunningham e Wells, 1989, *Science*, 244:1081-1085. Um resíduo ou grupo de resíduos alvo é identificado (por exemplo, resíduos carregados tais como arg, asp, his, lys, e glu) e substituído por um aminoácido neutro ou negativamente carregado (ainda mais preferencialmente alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com antigénio. As localizações de aminoácidos que demonstra sensibilidade funcional para as substituições são em seguida refinadas introduzindo variantes adicionais ou diversas em, ou para, os locais de substituição. Portanto, enquanto é predeterminado o local para introduzir uma variação de sequência de aminoácidos, a natureza da mutação por si mesma não precisa ser predeterminada. Por exemplo, para analisar a performance de uma mutação num dado local, é conduzida mutagênese aleatória ou de varrimento ala na região ou codão alvo e as variantes de anticorpos expressas são rastreadas para a atividade desejada. Mutagênese de varrimento de biblioteca, conforme descrito no presente documento, também pode ser usada para identificar localizações num anticorpo que são adequadas para mutagênese ou modificação.

Inserções de sequências de aminoácidos incluem fusões de terminal amino e/ou carboxilo variando em extensão de um resíduo até polipéptidos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-sequência de resíduos aminoácidos únicos ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionilo N-terminal ou o anticorpo fusionado a uma etiqueta de epítipo. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão ao N- ou C-terminal do anticorpo de uma enzima ou um polipéptido o qual aumenta a semivida sérica do anticorpo.

Substituições variantes têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula do anticorpo removido e um resíduo diferente inserido em seu local. Os locais de maior interesse para mutagénese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas alterações de FR também são contempladas. Substituições conservativas são mostradas no Quadro 1 sob o título de "substituições conservativas". Se tais substituições resultam numa alteração na atividade biológica, então alterações mais substanciais, denominadas "substituições exemplares" no Quadro 1, ou conforme adicionalmente descrito a seguir em referência a classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos rastreados.

Quadro 1: Substituições de Aminoácidos

| Resíduo Original | Substituições Conservativas | 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 |

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

Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são realizadas por meio da seleção de substituições que diferem significativamente em seu efeito sobre a manutenção de (a) a estrutura da estrutura principal do polipéptido na área da substituição, por exemplo, como uma conformação de placa ou helicoidal, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no local alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral. Resíduos que ocorrem naturalmente são divididos em grupos à base de propriedades de cadeias laterais comuns:

- (1) Hidrofóbicos: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr;
- (3) Acídicos: Asp, Glu;
- (4) Básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) Resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro; e
- (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Substituições não conservativas são feitas por meio da

permuta de um membro de uma destas classes por outra classe.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido em manter a conformação apropriada do anticorpo também pode ser substituído, geralmente com serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e evitar a reticulação aberrante. De modo inverso, uma ou mais ligações cisteína podem ser adicionadas ao anticorpo para melhorar sua estabilidade, particularmente onde o anticorpo é um fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv.

Modificações de aminoácidos podem variar entre alterar ou modificar um ou mais aminoácidos até completo redesenho de uma região, tal como a região variável. Alterações na região variável podem alterar a afinidade de ligação e/ou a especificidade. Em alguma forma de realização, são feitas não mais de uma a cinco substituições de aminoácidos conservativas dentro de um domínio CDR. Em outras formas de realização, são feitas não mais de uma a três substituições de aminoácidos conservativas dentro de um domínio CDR3. Em ainda outras formas de realização, o domínio CDR é CDRH3 e/ou CDR L3.

Modificações também incluem polipéptidos glicosilados e não glicosilados, bem como polipéptidos com outras modificações pós-traducionais, tais como, por exemplo, glicosilação com açúcares diferentes, acetilação, e fosforilação. Anticorpos são glicosilados em posições conservadas em suas 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 das proteínas (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, as quais podem afetar a conformação e a superfície tridimensional apresentada da glicoproteína (Hefferis e Lund, mencionado acima; Wyss e

Wagner, 1996, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416). Oligossacáridos também podem servir para ter por alvo uma dada glicoproteína para algumas moléculas à base de estruturas de reconhecimento específico. Também se relatou que a glicosilação de anticorpos afeta a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (CCDA). Em particular, relatou-se que células CHO com expressão de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII) regulada por tetraciclina, uma glicosiltransferase catalisadora da formação de GlcNAc bisseccionante, têm atividade de CCDA otimizada (Umana *et al.*, 1999, *Mature Biotech.* 17:176-180).

A glicosilação de anticorpos é tipicamente ou N-ligada ou O-ligada. N-ligada refere-se à fixação da porção de hidrato de carbono à cadeia lateral de um resíduo asparagina. As sequências tripeptídicas asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para fixação enzimática da porção de hidrato de carbono à cadeia lateral de asparagina. Deste modo, a presença de qualquer uma destas sequências tripeptídicas num polipéptido cria um local de glicosilação potencial. Glicosilação O-ligada refere-se à fixação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose, ou xilose a um hidroxiaminoácido, ainda mais comumente serina ou treonina, embora também possam ser usadas 5-hidroxi prolina ou 5-hidroxi lisina.

A adição de locais de glicosilação ao anticorpo é realizada convenientemente alterando a sequência de aminoácidos de tal modo que contém uma ou mais das sequências tripeptídicas descritas acima (para locais de glicosilação N-ligados). A alteração também pode ser feita pela adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos serina ou treonina à sequência do anticorpo original (para locais de glicosilação O-ligados).

O padrão de glicosilação dos anticorpos também pode ser alterado sem alterar a sequência de nucleótidos subjacente. A glicosilação depende em grande parte da célula hospedeira usada para expressar o anticorpo. Como o tipo de célula usada para expressão de glicoproteínas recombinantes, por exemplo, anticorpos, como terapêuticos potenciais é raramente a célula nativa, podem ser esperadas variações no padrão de glicosilação dos anticorpos (veja-se, por exemplo, Hse *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070).

Além das escolhas de células hospedeiras, fatores que afetam a glicosilação durante produção recombinante de anticorpos incluem modo de crescimento, formulação de meio, densidade da cultura, oxigenação, pH, esquemas de purificação e semelhantes. Foram propostos vários métodos para alterar o padrão de glicosilação obtido num organismo hospedeiro particular incluindo introduzir ou sobreexpressar algumas enzimas envolvidas na produção de oligossacáridos (Patentes US N° 5.047.335; 5.510.261 e 5.278.299). Glicosilação, ou alguns tipos de glicosilação, podem ser removidos enzimaticamente da glicoproteína, por exemplo usando endoglicosidase H (Endo H). Além disso, a célula hospedeira recombinante pode ser produzida por engenharia geneticamente para ser defeituosa no processamento de alguns tipos de polissacáridos. Estas e técnicas semelhantes são de conhecimento geral na especialidade.

Outros métodos de modificação incluem usar técnicas de ligação conhecidas na especialidade, incluindo, mas não limitadas a, meios enzimáticos, substituição oxidativa e quelação. Podem ser usadas modificações, por exemplo, para fixação de marcadores para imunoensaio. Polipéptidos E3 modificados são fabricados usando procedimentos estabelecidos na técnica e podem ser rastreados usando ensaios padrão conhecidos na técnica, alguns dos quais são

descritos a seguir e nos Exemplos.

Outras modificações de anticorpo incluem anticorpos que foram modificados conforme descrito na Publicação de Patente Internacional N° WO 99/58572, publicada em 18 de Novembro de 1999. Estes anticorpos compreendem, além de um domínio de ligação dirigido na molécula alvo, um domínio efetor que tem uma sequência de aminoácidos substancialmente homóloga a todo ou parte de um domínio constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina humana. Estes anticorpos têm a capacidade de ligar-se a molécula alvo sem iniciar um processo de lise dependente do complemento significativo, ou destruição do alvo mediada por células. Em algumas formas de realização, o domínio efetor tem a capacidade de ligar-se especificamente FcRn e/ou FcγRIIb. Estes são tipicamente à base de domínios quiméricos derivados de dois ou mais domínios CH2 de cadeia pesada de imunoglobulina humana. Anticorpos modificados desta maneira são particularmente adequados para utilização em terapêutica crônica com anticorpos, para evitar reações adversas inflamatórias e diversas a terapêutica convencional com anticorpos.

A divulgação também abrange proteínas de fusão que compreendem um ou mais fragmentos ou regiões dos anticorpos (tais como E3) ou polipéptidos desta invenção. Numa forma de realização, é proporcionado um polipéptido de fusão que compreende pelo menos 10 aminoácidos contíguos da região de cadeia leve variável mostrada na Figura 1B e/ou pelo menos 10 aminoácidos da região de cadeia pesada variável mostrada na Figura 1A. Em outra 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 mostrado nas Figuras 1A e 1B. Em outra forma de realização, o polipéptido de fusão compreende uma ou mais CDRs de E3. Em ainda outras formas de realização, o polipéptido de fusão compreende CDR H3 e/ou CDR L3 do anticorpo E3. Em

outra forma de realização, o polipéptido de fusão compreende qualquer um ou mais de: resíduo de aminoácido L29 de CDRH1, I50 de CDRH2, W101 de CD- RH3, 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 os fins desta invenção, uma proteína de fusão E3 contém um ou mais anticorpos E3 e outra sequência de aminoácidos à qual não está fixada na molécula nativa, por exemplo, uma sequência heteróloga ou uma sequência homóloga de outra região. Sequências heterólogas típicas incluem, mas não estão limitadas a uma "etiqueta" tal como uma etiqueta FLAG ou uma cauda de 6His. Etiquetas são de conhecimento geral na técnica.

Um polipéptido de fusão E3 pode ser criado por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, sinteticamente ou recombinantemente. Tipicamente, as proteínas de fusão E3 desta invenção são feitas por meio da preparação e expressão de um polinucleótido que codifica as mesmas usando métodos recombinantes descritos no presente documento, embora estas também possam ser preparadas por outros meios conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, síntese química.

Esta divulgação também proporciona composições que compreendem anticorpos E3 ou polipéptidos conjugados (por exemplo, ligados) a um agente que facilita a ligação a um suporte sólido (tal como biotina ou avidina). Por simplicidade, será feita referência geralmente a E3 ou anticorpos com o entendimento de que estes métodos se aplicam a quaisquer das formas de realização de ligação de NGF descritas no presente documento. Conjugação refere-se a ligação destes componentes conforme descrito no presente documento. A ligação (a qual é geralmente fixando estes componentes em próxima associação pelo menos para administração) pode ser realizada em qualquer número de modos. Por exemplo, é possível uma reação direta entre um

agente e um anticorpo quando cada uma possui um substituinte capaz de reagir com o outro. Por exemplo, um grupo nucleofílico, tal como um grupo amina ou sulfidrilo, por um lado pode ser capaz de reagir com um grupo contendo carbonilo, tal como um anidrido ou um haleto ácido, ou com um grupo alquilo contendo um bom grupo de partida (por exemplo, um haleto) pelo outro.

Um anticorpo ou polipéptido desta divulgação pode ser ligado a um agente de marcação (alternativamente denominado "marcador") tal como uma molécula fluorescente, uma molécula radioativa ou quaisquer outras etiquetas conhecidas na técnica. São conhecidas na técnica etiquetas as quais geralmente proporcionam (quer diretamente ou indiretamente) um sinal. Por conseguinte, a divulgação inclui polipéptidos e anticorpos marcados.

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

A invenção também proporciona composições (incluindo composições farmacêuticas) e *kits* que compreendem o anticorpo E3, e, conforme esta descoberta torna claro, qualquer um ou todos os anticorpos descritos no presente documento.

Polinucleótidos, vetores e células hospedeiras

A divulgação também proporciona polinucleótidos isolados que codifica os anticorpos e polipéptidos da divulgação (incluindo um anticorpo que compreende as sequências de polipéptido da cadeia leve e regiões variáveis de cadeia pesada mostrada nas Figuras 1A e 1B), e vetores e células hospedeiras que compreendem o polinucleótido.

Por conseguinte, a divulgação proporciona polinucleótidos (ou composições, incluindo composições farmacêuticas), que compreende polinucleótidos que codificam quaisquer dos seguintes: (a) anticorpo E3; (b) um fragmento ou uma região do anticorpo E3; (c) uma cadeia leve do anticorpo E3 conforme mostrado nas Figuras 1B; (d) uma cadeia pesada do anticorpo E3 conforme mostrado nas Figuras 1A; (e) uma ou mais regiões variáveis de uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada do anticorpo E3; (f) uma ou mais CDRs (uma, duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs) do anticorpo E3 mostrada nas Figuras 1A e 1B; (g) CDR H3 da cadeia pesada do anticorpo E3 mostrada na figura 1A; (h) CDR L3 da cadeia leve do anticorpo E3 mostrada na Figura 1B; (i) três CDRs da cadeia leve do anticorpo E3 mostrada na Figura 1B; (j) três CDRs da cadeia pesada do anticorpo E3 mostrada na Figura 1A; (k) três CDRs da cadeia leve e três CDRs da cadeia pesada, do anticorpo E3 mostrado nas Figuras 1A e 1B; ou (l) um anticorpo que compreende qualquer de (b) a (k). Em algumas formas de realização, o polinucleótido compreende qualquer um ou ambos dos polinucleótidos mostrados nas Figuras 2 e 3.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado que codifica uma cadeia leve de E3 com um número de depósito de ATCC N° PTA-4893 ou ATCC N° PTA-4894. Em outro aspeto, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado que codifica uma cadeia pesada de E3 com um número de depósito de ATCC N° PTA-4895. Em ainda outro aspeto, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado que compreende (a) uma região variável codificada no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N° PTA-4894 e (b) uma região variável codificada no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N° PTA-4895. Em outro aspeto, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado que compreende (a) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N° PTA-

4894; e/ou (b) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleótido com um número de depósito de ATCC N° PTA-4895.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona polinucleótidos que codificam quaisquer dos anticorpos (incluindo fragmentos de anticorpos) e polipéptidos descritos no presente documento. Polinucleótidos podem ser preparados por procedimentos conhecidos na técnica

Em outro aspeto, a divulgação proporciona composições (tais como algumas composições farmacêuticas) que compreendem quaisquer dos polinucleótidos da divulgação. Em algumas formas de realização, a composição compreende um vetor de expressão que compreende um polinucleótido que codifica o anticorpo E3 conforme descrito no presente documento. Em outra forma de realização, a composição compreende um vetor de expressão que compreende um polinucleótido que codifica quaisquer dos anticorpos ou polipéptidos descritos no presente documento. Em ainda outras formas de realização, a composição compreende qualquer um ou ambos os polinucleótidos mostrados nas Figuras 2 e 3. Vetores de expressão, e a administração de composições de polinucleótidos são adicionalmente descritos no presente documento.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um método para preparar quaisquer dos polinucleótidos descritos no presente documento.

Polinucleótidos complementares a qualquer uma de semelhantes sequências também são englobados pela presente invenção. Polinucleótidos pode ser de filamento único (codificante ou de sentido reverso) ou de filamento duplo, e podem ser moléculas de ADN (genómico, ADNc ou sintético) ou de ARN. Moléculas de ARN incluem moléculas de ARNHn, as quais contêm intrões e correspondem a uma molécula de ADN de uma maneira uma a uma, e moléculas de ARNm, as quais não contêm intrões. Sequências adicionais codificantes ou não

codificantes podem, mas não precisam, estar presentes dentro de um polinucleótido da presente divulgação, e um polinucleótido pode, mas não precisa, ser ligado a outras moléculas e/ou materiais de suporte.

Polinucleótidos podem compreender uma sequência nativa (isto é, uma sequência endógena que codifica um anticorpo ou uma porção do mesmo) ou podem compreender uma variante de uma sequência semelhante. Variantes de polinucleótidos contêm uma ou mais substituições, adições, eliminações e/ou inserções de tal modo que a imunorreatividade do polipéptido codificado não é diminuída, em relação a uma molécula imunorreativa nativa. O efeito sobre a imunorreatividade do polipéptido codificado geralmente pode ser avaliada conforme descrito no presente documento. Variantes preferencialmente apresentam pelo menos cerca de 70% de identidade, mais preferencialmente pelo menos cerca de 80% de identidade e ainda mais preferencialmente pelo menos cerca de 90% de identidade com uma sequência de polinucleótido que codifica um anticorpo nativo ou uma porção dos mesmos.

Diz-se que duas sequências de polinucleótido ou polipéptido são "idênticas" se a sequência de nucleótidos ou aminoácidos nas duas sequências for a mesma quando alinhadas para máxima correspondência conforme descrito a seguir. As comparações entre duas sequências são realizadas tipicamente comparando as sequências sobre uma janela de comparação para identificar e comparar regiões locais de similaridade de sequência. Uma "janela de comparação" conforme usado no presente documento, refere-se a um segmento de pelo menos cerca de 20 posições contíguas, geralmente 30 até cerca de 75, 40 até cerca de 50, nas quais uma sequência pode ser comparada com uma sequência de referência do mesmo número de posições contíguas depois das duas sequências serem alinhadas otimamente.

O alinhamento ótimo das sequências para comparação

pode ser conduzido usando o programa Megalign na *suite* do *software* de bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parâmetros por defeito. Este programa incorpora vários 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, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and 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, São Francisco, CA; Wilbur, W.J. e Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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 polipéptido ou polinucleótido na janela de comparação pode compreender adições ou eliminações (isto é, espaços) de 20 por cento ou menos, geralmente 5 a 15 por cento, ou 10 a 12 por cento, comparadas com as sequências de referência (as quais não compreendem adições ou eliminações) para ótimo alinhamento das duas sequências. A percentagem é calculada determinando o número de posições nas quais as bases de ácido nucleico idênticas ou resíduo de aminoácido ocorre em ambas as sequências para produzir o número de posições combinadas, dividindo o número de posições combinadas pelo número total de posições na sequência de referência (isto é o tamanho da janela) e multiplicando os resultados por 100

para produzir a percentagem de identidade de sequência.

Variantes também, ou alternativamente, podem ser substancialmente homólogas a um gene nativo, ou uma porção ou complemento do mesmo. As variantes de polinucleótidos referidas têm a capacidade de hibridar sob condições moderadamente restritivas a uma sequência de ADN que ocorre naturalmente que codifica um anticorpo nativo (ou uma sequência complementar).

"Condições moderadamente restritivas" adequadas incluem pré-lavagem numa solução de 5 X SSC, 0,5% de SDS, 1,0 mM de EDTA (pH 8,0); hibridação a 50 °C a 65 °C, 5 X SSC, de um dia para o outro; seguida por lavagem duas vezes a 65 °C por 20 minutos com cada de 2X, 0,5X e 0,2X SSC contendo 0, 1% de SDS.

Conforme usado no presente documento, "condições altamente restritivas" ou "condições de alta restringência" são aquelas que: (1) empregam baixa força iónica e alta temperatura para lavagem, por exemplo, 0,015 M de cloreto de sódio / 0,0015 M de citrato de sódio / 0,1% de dodecil sulfato de sódio a 50 °C; (2) empregam durante hibridação um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, 50% (em v/v) de formamida com 0,1% de albumina sérica bovina / 0,1% de Ficoll / 0,1% de polivinilpirrolidona / 50 mM de tampão de fosfato de sódio a 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 de 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 esperma de salmão sonificado (50 pg/ml), 0,1% de 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, seguida por uma lavagem de alta restringência consistindo em 0,1 x SSC que contém EDTA a 55 °C. O perito na especialidade reconhecerá como ajustar a temperatura, força iónica, e

etc. conforme necessário para conciliar fatores tais como extensão a sonda e semelhantes.

Será reconhecido pelos peritos na especialidade que, em consequência da degeneração do código genético, existem muitas sequências de nucleótidos que codificam um polipeptídeo conforme descrito no presente documento. Alguns destes polinucleótidos suportam homologia mínima com a sequência de nucleótidos de qualquer gene nativo. Não obstante, polinucleótidos que variam devido a diferenças na utilização de códons são especificamente contemplados pela presente invenção. Além disso, alelos dos genes que compreendem as sequências de polinucleótidos proporcionadas no presente documento, estão dentro do âmbito da presente invenção. Alelos são genes endógenos que são alterados em consequência de uma ou mais mutações, tais como eliminações, adições e/ou substituições de nucleótidos. O ARNm e a proteína resultantes podem, mas não precisam, ter uma estrutura ou função alterada. Podem ser identificados alelos usando técnicas padrão (tais como hibridação, amplificação e/ou comparação de sequência com o banco de dados).

Os polinucleótidos desta divulgação podem ser obtidos usando síntese química, métodos recombinantes, ou PCR. Métodos para síntese química de polinucleótido são de conhecimento geral na técnica e não precisam ser descritos em pormenores no presente documento. Um perito na especialidade pode usar as sequências proporcionadas no presente documento, e um sintetizador de ADN comercial para produzir uma sequência de ADN desejada.

Para preparar polinucleótidos usando métodos recombinantes, um polinucleótido que compreende uma sequência desejada pode ser inserido num vetor adequado, e o vetor por sua vez pode ser introduzido numa célula hospedeira adequada para replicação e amplificação, conforme adicionalmente discutido no presente documento.

Polinucleótidos podem ser inseridos em células hospedeiras por qualquer meio conhecido na técnica. As células são transformadas introduzindo um polinucleótido exógeno por captação direta, endocitose, transfeção, "F-mating" ou eletroporação. Uma vez introduzido, o polinucleótido exógeno pode ser mantido dentro da célula como um vetor não integrado (tal como um plasmídeo) ou integrado no genoma da célula hospedeira. O polinucleótido amplificado deste modo pode ser isolado da célula hospedeira por métodos de conhecimento geral dentro da técnica. Veja-se, por exemplo, Sambrook *et al.* (1989).

Alternativamente, PCR permite a reprodução de sequências de ADN. A tecnologia de PCR é de conhecimento geral na técnica e é descrita nas Patentes US N° 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).

ARN pode ser obtido usando o ADN isolado num vetor apropriado e inserindo o mesmo numa célula hospedeira adequada. Quando a célula se duplica e o ADN é transcrito em ARN, o ARN pode ser então isolado usando métodos de conhecimento geral dos peritos na especialidade, conforme determinado em Sambrook *et al.*, (1989), por exemplo.

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 disponível na técnica. Enquanto o vetor de clonagem selecionado pode variar de acordo com a célula hospedeira que se pretende usar, vetores de clonagem úteis geralmente terão a capacidade de autoduplicar, podem possuir um único alvo para uma endonuclease de restrição em particular, e/ou podem carregar genes para um marcador que pode ser usado na seleção de clones contendo o vetor. Exemplos adequados incluem plasmídeos e vírus bacterianos, por exemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por exemplo, pBS SK+) e seus derivados,

mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, fagos de ADN, e vetores de vaivém tais como pSA3 e pAT28. Estes e muitos outros vetores de clonagem estão disponíveis em vendedores comerciais tais como BioRad, Strategene, e Invitrogen.

Vetores de expressão geralmente são construções de polinucleótido replicáveis que contêm um polinucleótido de acordo com a invenção. Está implícito que um vetor de expressão deve ser replicável nas células hospedeiras ou como epissomas ou como uma parte integral do ADN cromossômico. Vetores de expressão adequados incluem mas não estão limitados a plasmídeos, vetores virais, incluindo adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus, cosmídeos, e um ou mais vetores de expressão descritos na Publicação de Patente Internacional PCT N° WO 87/04462. Os componentes vetoriais geralmente podem incluir, mas não estão limitados a, um ou mais dos seguintes: uma sequência de sinal; uma origem de replicação; um ou mais genes marcadores; elementos de controlo transcripcional adequados (tais como promotores, intensificadores e terminador). Para expressão (isto é, translação), também são geralmente requeridos um ou mais elementos de controlo transcripcional, tais como locais de ligação de ribossoma, locais de iniciação de translação, e codões de parada.

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

A divulgação também proporciona células hospedeiras que compreendem quaisquer dos polinucleótidos descritos no

presente documento. Quaisquer células hospedeiras capazes de sobreexpressar ADN heterólogos podem ser usadas para a finalidade de isolar os genes que codifica o anticorpo, polipéptido ou proteína de interesse, exemplos não limitantes de células hospedeiras de mamíferos incluem, mas não estão limitados a células COS, HeLa, e CHO. Veja-se também a Publicação de Patente Internacional PCT N° WO 87/04462. Células hospedeiras não mamíferas adequadas incluem procariotas (tais como *E. coli* ou *B. subtilis*) e levedura (tal como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; ou *K. lactis*). Preferencialmente, as células hospedeiras expressam os ADNs num nível de cerca de 5 vezes maior, mais preferencialmente 10 vezes maior, ainda mais preferencialmente 20 vezes maior do que o do anticorpo endógeno correspondente ou proteína de interesse, caso presente, nas células hospedeiras. O rastreio das células hospedeiras para uma ligação específica a NGF é realizado por um imunensaio ou FACS. Pode ser identificada uma célula que sobreexpressa o anticorpo ou proteína de interesse.

Métodos usando E3 e anticorpos derivados de E3

Anticorpo E3 o qual se liga a NGF pode ser usado para identificar ou detetar a presença ou ausência de NGF. Por simplicidade, será feita referência de modo geral a E3 ou anticorpos com o entendimento de que estes métodos se aplicam a quaisquer das formas de realização de ligação de NGF (tais como polipéptidos) descritas no presente documento. Deteção geralmente envolve contactar uma amostra biológica com um anticorpo descrito no presente documento, que se liga a NGF e a formação de um complexo entre NGF e um anticorpo (por exemplo, E3) o qual se liga especificamente a NGF. A formação de um complexo semelhante pode ser *in vitro* ou *in vivo*. O termo "deteção" conforme usado no presente documento, inclui deteção qualitativa e/ou quantitativa (níveis de medição) com ou sem referência a um controlo.

Pode ser usado para deteção qualquer um de uma variedade de métodos conhecidos, incluindo, mas não limitados a, imunoensaio, usando anticorpo que ligam o polipéptido, por exemplo, por ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA), ensaio radioimunológico (RIA) e semelhantes; e ensaio funcional para o polipéptido codificado, por exemplo, atividade de ligação ou ensaio enzimático. Em algumas formas de realização, o anticorpo é marcado de modo detetável.

Utilizações de Diagnóstico do E3 e Derivados

Anticorpos e polipéptidos da divulgação podem ser usados na deteção, diagnóstico e monitoração de uma doença, condição, ou distúrbio associado a expressão de NGF alterada ou aberrante (em algumas formas de realização, aumento ou redução da expressão de NGF (em relação a uma amostra normal), e/ou expressão inadequada, tal como presença de expressão num ou mais tecidos e/ou uma ou mais células que normalmente carecem de expressão de NGF, ou ausência de expressão de NGF num ou mais tecidos ou uma ou mais células que normalmente possuem expressão de NGF). Os anticorpos e polipéptidos da divulgação são adicionalmente úteis para deteção de expressão de NGF, por exemplo, numa doença associada a sensibilidade ou capacidade de resposta ao NGF alterada ou aberrante. Em algumas formas de realização, a expressão de NGF é detetada numa amostra de um indivíduo suspeito de ter uma doença, distúrbio caracterizado ou associado a uma sensibilidade ou capacidade de resposta a expressão de NGF alterada ou expressão aberrante (por exemplo, um cancro no qual NGF estimula crescimento e/ou metástase).

Portanto, em algumas formas de realização, a divulgação proporciona métodos que compreendem contactar um espécime (amostra) de um indivíduo suspeito de ter expressão de NGF alterada ou aberrante com um anticorpo ou polipéptido da invenção e determinar se o nível de NGF

difere do nível de um espécime de controlo ou de comparação. Em algumas formas de realização, o indivíduo tem uma arritmia cardíaca, doença de Alzheimer, e/ou disfunção autónoma.

Em outras formas de realização, a divulgação proporciona métodos que compreendem contactar um espécime (amostra) de um indivíduo e determinar o nível de expressão de NGF. Em algumas formas de realização, o indivíduo é suspeito de ter uma doença, distúrbio caracterizado ou associado a uma sensibilidade ou capacidade de resposta a expressão de NGF alterada ou aberrante. Em algumas formas de realização, o indivíduo tem cancro pulmonar de células pequenas, cancro de mama, cancro pancreático, cancro de próstata, carcinoma de ovário, carcinoma hepatocelular, ou melanoma.

Para aplicações de diagnóstico, o anticorpo tipicamente será marcado com uma porção detetável incluindo, mas não limitada a radioisótopos, etiquetas fluorescentes, e várias etiquetas de substratos enzimáticos. Métodos para conjugar etiquetas a um anticorpo são conhecidos na técnica. Em outras formas de realização da invenção, anticorpos da divulgação não precisam ser marcados, e a presença dos mesmos pode ser detetada usando um anticorpo marcado o qual se liga aos anticorpos da invenção.

Os anticorpos da presente divulgação podem ser utilizados em qualquer método de ensaio conhecido, os ensaios de ligação competitiva referidos, ensaios de sanduíche direto e indireto, e ensaios de imunoprecipitação. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Os anticorpos também podem ser usados para ensaios de diagnóstico *in vivo*, tais como estudo por imagens *in vivo*. De modo geral, o anticorpo é marcado com um radionuclídeo (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ou ^3H) de modo que

as células ou tecido de interesse podem ser localizadas usando imunocintilografia.

O anticorpo também pode ser usado como reagente de tintura em patologia, seguindo técnicas de conhecimento geral na técnica.

Métodos para utilizar E3 e derivados para fins terapêuticos

O anticorpo E3 é útil para reduzir e/ou bloquear a biológica atividade do NGF. Acredita-se que esta atividade antagonista seja útil no tratamento de condições patológicas associadas a produção endógena de NGF, tais como dor. Geralmente, nestas formas de realização uma quantidade eficaz é administrada a um indivíduo. Por conseguinte, num aspeto, a divulgação proporciona um método para antagonizar a atividade biológica de NGF humano usando quaisquer dos polipéptidos (incluindo anticorpos tais como anticorpo E3) descritos no presente documento. Numa forma de realização, o método compreende contactar o fator de crescimento dos nervos humano com quaisquer dos polipéptidos (incluindo anticorpo E3) descritos no presente documento, por meio do qual a atividade do fator de crescimento dos nervos humano é antagonizada, reduzida, bloqueada, ou suprimida. Em ainda outra forma de realização, a um indivíduo com dor (tal como dor pós-cirúrgica, ou dor da artrite reumatoide) é administrado tratamento com E3.

Por simplicidade, será feita referência de modo geral a E3 ou anticorpo com o entendimento de que estes métodos se aplicam a quaisquer dos polipéptidos e anticorpos variantes E3 descritos no presente documento.

Podem ser usadas para administração várias formulações de E3 ou fragmentos de E3 (por exemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, e etc.), tais como de cadeia única (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão que compreendem uma porção de anticorpo, e qualquer outra configuração modificada de E3 que compreende um local de reconhecimento antigénico de

NGF da especificidade requerida. Em algumas formas de realização, anticorpos E3 ou várias formulações de E3 dos mesmos podem ser administrados puros. Em outras formas de realização, E3 ou várias formulações de E3 (incluindo qualquer forma de realização de composição descrita no presente documento) dos mesmos e um excipiente farmacologicamente aceitável são administrados, e podem estar em várias formulações. 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 dar forma ou consistência, ou agir como um diluente. Excipientes adequados incluem mas não estão limitados a agentes estabilizantes, agentes humectantes e emulsificantes, sais para variar a osmolaridade, agentes de encapsulação, tampões, e intensificadores de penetração na pele. Excipientes bem como formulações para libertação de fármacos parentéricos e não parentéricos são determinadas em Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. Mack Publishing (2000).

Em algumas formas de realização, estes agentes são formuladas para administração por injeção (por exemplo, por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via subcutânea, por via intramuscular, e etc.), embora outras formas de administração (por exemplo, oral, via mucosa, através de inalação, por via sublingual, e etc) também possam ser usadas. Por conseguinte, anticorpo E3 e equivalentes dos mesmos são preferencialmente combinados com veículos farmacologicamente aceitáveis tais como salina, solução de Ringer, solução de dextrose, e semelhantes. O regime de dosagem em particular, isto é, dose, momento e repetição, dependerá do indivíduo em particular e do histórico médico do indivíduo. De modo geral, pode ser usada qualquer uma das doses seguintes: 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, é administrado. Para administrações repetidas durante vários dias ou mais tempo, dependendo da condição, o tratamento é sustentado até ocorrer uma supressão desejada dos sintomas da doença. Um regime de dosagem típico compreende administrar uma dose inicial de cerca de 2 mg/kg, seguida por uma dose de manutenção semanal de cerca de 1 mg/kg do anticorpo anti-NGF, ou seguida por uma dose de manutenção de cerca de 1 mg/kg a cada duas semanas. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis, dependendo do padrão de decomposição farmacocinética que o médico pretende obter. Considerações empíricas, tais como a semivida, geralmente contribuirão para a determinação da dosagem. O progresso desta terapêutica é facilmente monitorizado por técnicas e ensaios convencionais.

Em alguns indivíduos, pode ser requerida mais de uma dose. A frequência de administração pode ser determinada e ajustada durante o curso da terapêutica. Por exemplo, a frequência de administração pode ser determinada e ajustada com base no tipo e gravidade da dor a ser tratada, se o agente for administrado para fins preventivos ou terapêuticos, terapêutica prévia, o histórico clínico do paciente e a resposta ao agente, e a critério do médico assistente. Tipicamente o médico administrará um anticorpo antagonista anti-NGF (tal como E3), até ser atingida uma dosagem que obtém o resultado desejado. Em alguns casos, podem ser apropriadas formulações de libertação contínua sustentada de anticorpos E3. Várias formulações e

dispositivos para obter libertação sustentada são conhecidos na técnica.

Numa forma de realização, as dosagens para anticorpos E3 (ou polipéptidos) podem ser determinadas empiricamente em indivíduos aos quais foram administradas uma ou mais administrações. Aos indivíduos são administradas dosagens incrementais de E3. Para avaliar a eficácia de E3 ou outro anticorpo equivalente, podem ser monitorizados marcadores dos sintomas de doença (tais como dor).

A administração de um anticorpo (tal como E3) ou polipéptido de acordo com o método na presente invenção pode ser contínua ou intermitente, dependendo, por exemplo, da condição fisiológica do recetor, se a finalidade da administração for terapêutica ou profilática, e outros fatores de conhecimento dos clínicos habilitados. A administração de um anticorpo pode ser essencialmente contínua durante um período de tempo pré-selecionado ou pode ser numa série de dose espaçadas, por exemplo, ou antes, durante, ou depois do desenvolvimento de dor, antes, durante, antes e depois, durante e depois, ou antes, durante, e depois do desenvolvimento de dor.

Outras formulações incluem formas de libertação adequada conhecidas na técnica incluindo, mas não limitadas a, veículos tais como lipossomas. Veja-se, por exemplo, Mahato *et al.* (1997) *Pharm. Fies.* 14:853-859. Preparações lipossómicas incluem, mas não estão limitadas a, citofectinas, vesículas multilamelares e vesículas unilamelares.

Em algumas formas de realização, mais de um anticorpo ou polipéptido podem estar presentes. Os anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais. Tais composições podem conter pelo menos um, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco diferentes anticorpos. Uma mistura de anticorpos, como são frequentemente denotados na técnica, pode ser particularmente útil no

tratamento de uma gama mais ampla de população de indivíduos.

Um polinucleótido que codifica quaisquer dos anticorpos da invenção (tais como anticorpo E3) também pode ser usado para libertação e expressão de quaisquer dos anticorpos da invenção (tais como anticorpo E3) numa célula desejada. É evidente que um vetor de expressão pode ser usado para orientar a expressão de um anticorpo ou polipéptido E3. O vetor de expressão pode ser administrado por quaisquer meios conhecidos na técnica, tais como por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via intramuscular, por via subcutânea, por via intratecal, por via intraventricular, por via oral, por via entérica, por via parentérica, por via intranasal, por via dérmica, por via sublingual, ou por inalação. Por exemplo, a administração de vetores de expressão inclui administração local ou sistêmica, incluindo injeção, administração oral, pistola de partículas ou administração cateterizada, e administração tópica. Um perito na especialidade está familiarizado com a administração de vetores de expressão para obter a expressão de uma proteína exógena *in vivo*. Veja-se, por exemplo, as Patentes US N° 6.436.908; 6.413.942; e 6.376.471.

Também pode ser usada a libertação orientada de composições terapêuticas que compreendem um polinucleótido que codifica quaisquer dos anticorpos da invenção (tais como anticorpo E3). Técnicas de libertação de ADN mediada por recetores são descritas, por exemplo, em 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. (USA) (1990) 87:3655; Wu *et al.*, J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Composições terapêuticas que contêm um polinucleótido são

administradas dentro de um intervalo de cerca de 100 ng até cerca de 200 mg de ADN para administração local num protocolo de terapêutica genética. Intervalos de concentração de cerca de 500 ng até cerca de 50 mg, cerca de 1 µg até cerca de 2 mg, cerca de 5 µg até cerca de 500 µg, e cerca de 20 µg até cerca de 100 µg de ADN também podem ser usadas durante um protocolo de terapêutica genética. Os polinucleótidos terapêuticos e polipéptidos da presente invenção podem ser libertados usando veículos de libertação genética. O veículo de libertação genética pode ser de origem viral ou não viral (veja-se, de modo 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 de semelhantes sequências codificantes pode ser induzida usando promotores endógenos mamíferos ou heterólogos. A expressão da sequência codificante pode ser ou constitutiva ou regulada.

Vetores à base de vírus para libertação de um polinucleótido desejado e expressão numa célula desejada são de conhecimento geral na técnica. Veículos à base de vírus típicos incluem, mas não estão limitados a, retrovírus recombinantes (veja-se, por exemplo, as Publicações de Patentes Internacionais N° WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; as Patentes US N° 5. 219,740; 4.777.127; a Patente da Reino Unido N° 2.200.651; e a Patente Europeia EP No. 0 345 242), vetores à base de alfa-vírus (por exemplo, vetores de vírus Sindbis, vírus da floresta de Semliki (ATCC VR- 67; ATCC VR-1247), vírus do rio Ross (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) (veja-se, por exemplo, as Publicações de Patentes Internacionais N° WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO

94/28938; WO 95/11984 e WO 95/00655). Também pode ser utilizada a administração de ADN ligado a adenovírus morto conforme descrito em Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.

Também podem ser utilizados veículos e métodos de libertação não viral, incluindo, mas não limitados a, ADN condensado polycatiónico ligado ou não ligado a adenovírus mortos sozinhos (veja-se, por exemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); ADN ligado a ligante (veja-se, por exemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); células de veículos de libertação de células eucarióticas (veja-se, por exemplo, a Patente US N° 5.814.482; as Publicações de Patente Internacional PCT N° WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; e WO 97/42338) e neutralização de carga nucleica ou fusão com membranas celulares. Também pode ser utilizado ADN nu. Métodos de introdução de ADN nu típicos são descritos na Publicação de Patente Internacional PCT N° WO 90/11092 e na Patente US N° 5.580.859. Lipossomas que podem agir como veículos de libertação genética são descritos na Patente US N° 5.422.120; nas Publicações de Patente Internacional PCT N° WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; e na Patente Europeia EP N° 0 524 968. Abordagens adicionais são descritas em Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411 e em Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581.

Com respeito a todos os métodos descritos no presente documento, referência a anticorpos antagonistas anti-NGF também incluem composições que compreendem um ou mais destes agentes. Estas composições podem compreender adicionalmente excipientes adequados, tais como excipientes farmacologicamente aceitáveis incluindo tampões, os quais são de conhecimento geral na técnica. A presente invenção pode ser usada sozinha ou em combinação com outros métodos de tratamento convencionais.

UTILIZAÇÃO DE UM ANTICORPO ANTAGONISTA ANTI-NGF PARA MELHORAR A FUNÇÃO FÍSICA NA OSTEOARTRITE

A invenção proporciona a utilização de um anticorpo antagonista anti-NGF no fabrico de um medicamento para melhorar a função física num indivíduo tendo osteoartrite. A invenção proporciona adicionalmente um anticorpo antagonista anti-NGF para utilização na melhoria da função física num indivíduo tendo osteoartrite. A invenção proporciona adicionalmente a utilização de um anticorpo antagonista anti-NGF no fabrico de um medicamento para tratar a dor, melhorar a função física e melhorar a rigidez num indivíduo com osteoartrite. A divulgação proporciona ainda um anticorpo antagonista anti-NGF para utilização no tratamento da dor, melhoria da função física e melhora da rigidez num indivíduo com osteoartrite.

A divulgação também proporciona métodos para tratar e/ou prevenir a dor da osteoartrite em indivíduos incluindo mamíferos, tanto humanos quanto não humanos. Consequentemente, a divulgação proporciona métodos de tratamento da dor da osteoartrite num indivíduo que compreende administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF). Antagonistas de NGF, incluindo anticorpos antagonistas anti-NGF, são conhecidos na técnica e descritos no presente documento.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona métodos para reduzir a incidência de, melhorar, suprimir, aliviar, e/ou retardar o início, o desenvolvimento ou a progressão da dor da osteoartrite num indivíduo. Portanto, em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado antes do desenvolvimento de dor ou um episódio de dor num indivíduo com osteoartrite.

O diagnóstico ou avaliação da dor da osteoartrite está bem estabelecido na técnica. A avaliação pode ser realizada com base em medições conhecidas na técnica, tais como

caracterização da dor no paciente usando várias escalas de dor. Veja-se, por exemplo, 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, pode ser utilizada a WOMAC Ambulation Pain Scale (incluindo dor, rigidez, e função física) e 100 mm Visual Analogue Scale (VAS) para avaliar a dor e avaliar a resposta ao tratamento.

Um anticorpo antagonista anti-NGF podem ser administrados a um indivíduo através de qualquer via adequada. Exemplos de diferentes vias de administração são descritos no presente documento.

Em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez a cada cinco semanas, uma vez a cada seis semanas, uma vez a cada sete semanas, uma vez a cada oito semanas, uma vez a cada nove semanas, uma vez a cada dez semanas, uma vez a cada quinze semanas, uma vez a cada vinte semanas, uma vez a cada vinte e cinco semanas, ou uma vez a cada vinte e seis semanas. Em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, uma vez a cada quatro meses, uma vez a cada cinco meses, ou uma vez a cada seis meses.

O alívio da dor pode ser caracterizado pelo curso de tempo de alívio. Por conseguinte, em algumas formas de realização, o alívio da dor é observado dentro de cerca de 24 horas depois da administração de um anticorpo antagonista anti-NGF. Em outras formas de realização, o alívio da dor é observado dentro de cerca de 36, 48, 60, 72 horas ou 4 dias depois da administração do anticorpo antagonista anti-NGF. Em algumas formas de realização, a frequência e/ou a intensidade da dor é diminuída, e/ou é aumentada a qualidade de vida daqueles sofrendo da doença.

Em algumas formas de realização, o alívio da dor para osteoartrite é proporcionado por duração de pelo menos cerca de 7 dias, pelo menos cerca de 14 dias, pelo menos cerca de 21 dias, pelo menos cerca de 28 dias, pelo menos cerca de 35 dias, pelo menos cerca de 42 dias, pelo menos cerca de 49 dias, pelo menos cerca de 56 dias, pelo menos cerca de 63 dias, pelo menos cerca de 70 dias, pelo menos cerca de 77 dias, pelo menos cerca de 84 dias, pelo menos cerca de 180 dias, ou mais depois de uma única dose do anticorpo antagonista anti-NGF.

Preparação e utilização de anticorpos anti-NGF para estes métodos são descritos nas secções abaixo ("Antagonistas de NGF "Anticorpo antagonista anti-NGF"; "Outros antagonistas de NGF"; "Identificação de antagonistas de NGF (tais como anticorpos antagonistas anti-NGF)"; "Composições para utilização nos métodos da divulgação"; "Administração de um antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF)").

Antagonistas de NGF

A invenção refere-se a anticorpos antagonistas anti-NGF como antagonistas de NGF. Outros antagonistas de NGF que se referem a qualquer molécula que bloqueia, suprime ou reduz (incluindo significativamente) a atividade biológica do NGF, incluindo vias a jusante mediadas por sinalização de NGF, tais como ligação de recetores e/ou provocação de uma reação celular a NGF são revelados para propósitos comparativos. O termo "antagonista" não implica qualquer mecanismo específico de ação biológica, e considera-se que inclui expressamente e abrange todas as interações possíveis farmacológicas, fisiológicas, e bioquímicas com NGF e suas consequências as quais podem ser obtidas por uma variedade de composições diferentes e quimicamente divergentes. Antagonistas de NGF típicos incluem, mas não estão limitados a, um anticorpo anti-NGF, uma molécula de sentido reverso dirigida para NGF (incluindo uma molécula

de sentido reverso dirigida para um ácido nucleico que codifica NGF), uma molécula de sentido reverso dirigida para recetor de NGF (tal como recetor TrkA e/ou p75) (incluindo uma molécula de sentido reverso dirigida para um ácido nucleico que codifica TrkA e/ou p75), um composto inibidor de NGF, um análogo estrutural de NGF, uma mutação dominante-negativa de um recetor TrkA que se liga um NGF, uma imunoadesina TrkA, um anticorpo anti-TrkA, uma mutação dominante-negativa de um p75 recetor que se liga um NGF, um anticorpo anti-p75, e um inibidor de quinase. Para os fins da presente invenção, será explicitamente entendido que o termo "antagonista" abrange todos os termos, títulos, e estados funcionais previamente identificados e características por meio dos quais o próprio NGF, uma atividade biológica de NGF (incluindo, mas não limitada a sua capacidade de mediar qualquer aspeto de dor), ou as consequências da atividade biológica, são substancialmente anuladas, reduzidas, ou neutralizadas em qualquer grau significativo. Em algumas formas de realização, um antagonista de NGF (por exemplo, um anticorpo) liga-se a (interage fisicamente com) NGF, liga-se a um recetor de NGF (tal como recetor TrkA e/ou recetor p75), e/ou reduz (impede e/ou bloqueia) a sinalização de recetores de NGF a jusante. Por conseguinte, em algumas formas de realização, um antagonista de NGF liga-se a (interage fisicamente com) NGF. Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF é um polipéptido o qual se liga a NGF. Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF é um péptido ou um péptido modificado (tal como péptido de ligação de NGF fusionado a um domínio Fc) descrito na Publicação de Patente Internacional PCT N° WO 2004/026329. Em outra forma de realização, um antagonista de NGF liga a um recetor de NGF (tal como recetor trkA ou p75). Em outras formas de realização, um antagonista de NGF reduz (impede e/ou bloqueia) a sinalização de recetores de NGF a jusante (por

exemplo, inibidores de sinalização de quinase). Em outras formas de realização, um antagonista de NGF inibe (reduz) a síntese e/ou libertação de NGF. Em outra forma de realização, o antagonista de NGF é um antagonista de NGF que não é uma imunoadesina TrkA (isto é, é diferente de uma imunoadesina TrkA). Em outra forma de realização, o antagonista de NGF é diferente de um anticorpo anti-NGF. Em outra forma de realização, o antagonista de NGF é diferente de uma imunoadesina TrkA e diferente de um anticorpo anti-NGF. Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF liga NGF (tal como hNGF) e não se liga significativamente a neurotrofinas relacionadas, tais como NT-3, NT4/5, e/ou BDNF. Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF não está associado a uma reação imune adversa. Em outras formas de realização, o antagonista de NGF é um anticorpo anti-NGF. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF é humanizado (tal como anticorpo E3 descrito no presente documento). Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é anticorpo E3 (conforme descrito no presente documento). Em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF compreende uma ou mais CDRs do anticorpo E3 (tais como uma, duas, três, quatro, cinco, ou, em algumas formas de realização, todas as seis CDRs de E3). Em outras formas de realização, o anticorpo é humano. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF compreende a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada mostrada na Figura 1A (SEQ ID NO: 1) e a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve mostrada na Figura 1B (SEQ ID NO: 2). Em ainda outras formas de realização, o anticorpo compreende uma região constante modificada, tal como uma região constante que é imunologicamente inerte, por exemplo, não inicia um processo de lise mediada pelo complemento, ou não estimula citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (CCDA). Em outras formas de realização, a região constante

é modificada conforme descrito em Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; Pedido PCT N° PCT/GB99/01441; e/ou Pedido de Patente do Reino Unido N° 9809951.8.

Anticorpo antagonista anti-NGF

As utilizações médicas da invenção utilizam um anticorpo antagonista anti-NGF, o qual se refere a qualquer molécula de anticorpo que bloqueia, suprime ou reduz (incluindo significativamente) a atividade biológica do NGF, incluindo vias a jusante mediadas por sinalização de NGF, tais como ligação de recetores e/ou provocação de uma reação celular a NGF.

Um anticorpo antagonista anti-NGF deve apresentar qualquer uma ou mais das seguintes características: (a) ligam a NGF e inibem a atividade biológica de NGF ou vias a jusante mediados por função de sinalização de NGF; (b) previnem, melhoram, ou tratam qualquer aspeto de dor da artrite reumatoide ou dor da osteoartrite; (c) bloqueiam ou reduzem ativação de recetores de NGF (incluindo dimerização e/ou autofosforilação de recetor TrkA); (d) aumentam a depuração de NGF; (e) inibem (reduzem) a síntese, produção ou libertação de NGF. Anticorpos antagonistas anti-NGF são conhecidos na técnica, veja-se, por exemplo, a Publicação de Patente Internacional N° WO 01/78698, WO 01/64247, as Patentes US N° 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); N° de Acesso do GenBank U39608, U39609, L17078, ou L17077. Anticorpos antagonistas anti-NGF e polipéptidos também são descritos na Publicação de Patente Internacional N° WO 2005/019266.

Para os fins desta invenção, o anticorpo reage com NGF de uma maneira que inibe NGF e/ou vias a jusante mediadas pela função de sinalização de NGF. Em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF reconhece NGF humano. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF especificamente liga NGF humano. Em

alguma forma de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF não se liga significativamente a neurotrofinas relacionadas, tais como NT-3, NT4/5, e/ou BDNF. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF é capaz de ligar-se NGF e inibir de modo eficaz a ligação de NGF a seu recetor TrkA e/ou p75 *in vivo* e/ou inibir de modo eficaz a ativação por NGF de seu recetor TrkA e/ou p75. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo monoclonal. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF é humanizado (tal como anticorpo E3 descritos no presente documento). Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é humano. Veja-se, por exemplo, a publicação de Patente Internacional N° WO 2005/019266. Numa forma de realização, o anticorpo é um anticorpo humano o qual reconhece um ou mais epítomos sobre NGF humano. Em outra forma de realização, o anticorpo é um anticorpo de ratinho ou de rato o qual reconhece um ou mais epítomos sobre NGF humano. Em outra forma de realização, o anticorpo reconhece um ou mais epítomos sobre um NGF selecionado entre o grupo consistindo em: primata, canino, felino, equino, e bovino. Em ainda formas de realização adicionais, o anticorpo antagonista anti-NGF liga essencialmente o mesmo NGF epítopo 6 como um anticorpo selecionado entre qualquer um ou mais dos seguintes: MAb 911, MAb 912 e MAb 938 (Veja-se Hongo, *et al.*, Hybridoma 19:215-227 (2000)). Em outras formas de realização, o anticorpo liga-se ao mesmo epítopo que Mab 911. Em outra forma de realização, o anticorpo compreende uma região constante que é imunologicamente inerte (por exemplo, não inicia um processo de lise mediada pelo complemento ou citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (CCDA)). A atividade de CCDA pode ser avaliada usando métodos descrito na Patente US N° 5.500.362. Em algumas formas de realização, a região constante é modificada conforme descrito em Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624;

Pedido PCT N.º PCT/GB99/01441; e/ou Pedido de Patente do Reino Unido N.º 9809951.8

Em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo anti-NGF monoclonal de ratinho humanizado denominado anticorpo "E3", quaisquer dos anticorpos relacionados com E3 descritos no presente documento, ou quaisquer fragmentos dos mesmos, os quais são antagonistas de NGF.

Os anticorpos úteis na presente invenção podem englobar anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, fragmentos de anticorpos (por exemplo, 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 antigénico da especificidade requerida, incluindo variantes de glicosilação de anticorpos, sequência de aminoácidos variantes de anticorpos, e anticorpos modificados de modo covalente. Os anticorpos podem ser murinos, de rato, humano, ou de qualquer outra origem (incluindo quiméricos ou anticorpos humanizados).

A afinidade de ligação de um anticorpo antagonista anti-NGF a NGF (tal como hNGF) pode ser cerca de 0,10 até cerca de 0,80 nM, cerca de 0,15 até cerca de 0,75 nM e cerca de 0,18 até cerca de 0,72 nM. Numa forma de realização, a afinidade de ligação é entre cerca de cerca de 2 pM e 22 pM. Numa forma de realização, a afinidade de ligação é entre em torno de cerca de 23 pM e cerca de 100 pM. Numa forma de realização, a afinidade de ligação é cerca de 10 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é menos de cerca de 10 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é cerca de 0,1 nM ou cerca de 0,07 nM. Em outras formas de realização, a

afinidade de ligação é menos de cerca de 0,1 nM ou menos de cerca de 0,07 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é qualquer uma de cerca de 100 nM, cerca de 50 nM, cerca de 10 nM, cerca de 1 nM, cerca de 500 pM, cerca de 100 pM, ou cerca de 50 pM a qualquer 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 uma de cerca de 100 nM, cerca de 50 nM, cerca de 10 nM, cerca de 1 nM, cerca de 500 pM, cerca de 100 pM, ou cerca de 50 pM, ou menos de cerca de 50 pM. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é menos de qualquer uma de cerca de 100 nM, cerca de 50 nM, cerca de 10 nM, cerca de 1 nM, cerca de 500 pM, cerca de 100 pM, ou cerca de 50 pM. Em ainda outras formas de realização, a afinidade de ligação é 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 mais de cerca de 40 pM.

Um modo para 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 expresso de modo recombinante. A afinidade de um fragmento Fab anti-NGF de um anticorpo pode ser determinada por ressonância de plasmão superficial (sistema de ressonância de plasmão superficial BIAcore3000™ (SPR), BIAcore, INC, Piscaway NJ). Chips de CM5 podem ser ativados com cloridrato de N-etil-N43-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. NGF humano (ou qualquer outro NGF) pode ser diluído em acetato de sódio a 10 mM pH 4,0 e injetado sobre o chip ativado numa concentração de 0,005 mg/ml. Usando tempo de fluxo variável através dos canais dos chips individuais, podem ser obtidas duas intervalos de densidade

antigénica: 100-200 unidades de resposta (RU) para estudos cinéticos pormenorizados e 500-600 RU para ensaios de rastreio. O chip pode ser bloqueado com etanolamina. Estudos de regeneração mostraram que uma mistura de tampão de elutriação de Pierce (N° de Produto 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) e NaCl a 4 M (2:1) remove de modo eficaz o Fab ligado ao mesmo tempo em que mantém a atividade de hNGF sobre o chip por mais de 200 injeções. Tampão HBS-EP (HEPES a 0,01 M, pH 7,4, 0,15 NaCl, EDTA a 3 mM, 0,005% de Tensioativo P29) é usado como tampão de funcionamento para os ensaios BIAcore. Diluições seriais (0,1-10x K_D estimada) de amostras de Fab purificado são injetadas por 1 min a 100 μ L/min e são permitidos tempos de dissociação de até 2 h. As concentrações das proteínas Fab são determinadas por ELISA e/ou eletroforese SDS-PAGE usando um Fab de concentração conhecida (determinado por análise de aminoácidos) como um padrão. Índices de associação cinética (k_{on}) e índices de dissociação (k_{off}) são obtidos simultaneamente por meio do ajuste dos dados para um modelo de ligação de Langmuir a 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99- 110) usando o programa BIAevaluation. Os valores das constantes 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-se a NGF humano, e não liga significativamente um NGF de outra espécie de vertebrado (em algumas formas de realização, mamífero). Em algumas formas de realização, o anticorpo

liga-se a NGF humano bem como um ou mais NGF de outra espécie de vertebrado (em algumas formas de realização, mamífero). Em ainda outras formas de realização, o anticorpo liga-se a NGF e não tem reação cruzada significativamente com outras neurotrofinas (tais como as neurotrofinas relacionadas, NT3, NT4/5, e/ou BDNF). Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a NGF bem como pelo menos uma neurotrofina diversa. Em algumas formas de realização, o anticorpo liga a uma espécie de NGF de mamífero, tal como cavalo ou cão, mas não se liga significativamente a NGF de outra espécie de mamífero.

O um ou mais epítomos podem ser contínuos ou descontínuos. Numa forma de realização, o anticorpo liga essencialmente os mesmos epítomos de hNGF que um anticorpo selecionado entre o grupo consistindo em MAb 911, MAb 912, e MAb 938 conforme descrito em Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 19:215-227 (2000). Em outra forma de realização, o anticorpo liga essencialmente o mesmo epítomo de hNGF que MAb 911. Em ainda outra forma de realização, o anticorpo liga essencialmente o mesmo epítomo que MAb 909. Hongo *et al.*, mencionado acima. Por exemplo, o epítomo pode compreender um ou mais de: resíduos K32, K34 e E35 dentro da região variável 1 (aminoácidos 23-35) de hNGF; resíduos F79 e T81 dentro da região variável 4 (aminoácidos 81-88) de hNGF; resíduos H84 e K88 dentro da região variável 4; resíduo R103 entre a região variável 5 (aminoácidos 94-98) de hNGF e o C-terminal (aminoácidos 111-118) de hNGF; resíduo E11 dentro da região pré-variável 1 (aminoácidos 10-23) de hNGF; Y52 entre a região variável 2 (aminoácidos 40-49) de hNGF e a região variável 3 (aminoácidos 59-66) de hNGF; resíduos L112 e S113 dentro do C-terminal de hNGF; resíduos R59 e R69 dentro da região variável 3 de hNGF; ou resíduos V18, V20, e G23 dentro da região pré-variável 1 de hNGF. Além disso, um epítomo pode compreender uma ou mais entre a região variável 1, a região variável 3, a região

variável 4, a região variável 5, a região de N-terminal, e/ou o C-terminal de hNGF. Em ainda outra forma de realização, o anticorpo reduz significativamente a acessibilidade a solvente do resíduo R103 de hNGF. Entende-se que embora os epítomos descritos acima se refiram a NGF humano, uma pessoa de conhecimento regular pode alinhar as estruturas de NGF humano com o NGF de outra espécie e identificar complementos prováveis para estes epítomos.

Num aspeto, anticorpos (por exemplo, humanos, humanizados, de ratinho, quiméricos) que podem inibir NGF podem ser preparados usando agente imunogénicos que expressam sequência de NGF de extensão total ou parcial. Em outro aspeto, pode ser usado um agente imunogénico que compreende uma célula que sobreexpressa NGF. Outro exemplo de um agente imunogénico que pode ser usado é proteína de NGF que contém NGF de extensão total ou uma porção da proteína de NGF.

Os anticorpos antagonistas anti-NGF podem ser preparados por qualquer método conhecido na técnica. A via e esquema de imunização do animal hospedeiro são de modo geral acompanhando técnicas estabelecidas e convencionais para estimulação e produção de anticorpos, conforme adicionalmente descrito no presente documento. Técnicas gerais para produção de anticorpos humanos e de ratinho são conhecidos na técnica e são descritas no presente documento.

Contempla-se que qualquer indivíduo mamífero incluindo seres humanos ou células dos mesmos produtoras de anticorpos podem ser manipulados para servir como a base para a produção de linhas celulares de hibridoma, mamífero, incluindo humano. Tipicamente, o animal hospedeiro é inoculado por via intraperitoneal, por via intramuscular, por via oral, por via subcutânea, intraplantar, e/ou por via intradérmica com uma quantidade de agente imunogénico, incluindo conforme descrito no presente documento.

Hibridomas podem ser preparados a partir dos linfócitos e de células de mieloma imortalizadas usando a técnica de hibridação 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). Linhas de mieloma disponíveis, incluindo, mas não limitadas a X63- Ag8,653 e as do Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EUA, podem ser usadas na hibridação. De modo geral, a técnica envolve fundir células de mieloma e células linfoides usando um fusogénio tal como polietilenoglicol, ou por meios elétricos de conhecimento geral dos peritos na especialidade. Depois da fusão, as células são separadas do meio de fusão e cultivadas num meio de crescimento seletivo, tal como meio de hipoxantina-aminopterinatimidina (HAT), para eliminar células parentais não hibridadas. Pode ser usado qualquer um dos meios descritos no presente documento, suplementado com ou sem soro, para cultivar hibridomas que segregam anticorpos monoclonais. Como outra alternativa à técnica de fusão celular, células B imortalizadas EBV podem ser usadas para produzir os anticorpos anti-NGF monoclonais da presente divulgação. Os hibridomas são expandidos e subclonados, caso desejado, e os sobrenadantes são testados para atividade anti agente imunogénico por procedimentos de imunoensaio convencionais (por exemplo, ensaio radioimunológico, imunoensaio enzimático, ou imunoensaio de fluorescência).

Hibridomas que podem ser usados como fonte de anticorpos abrangem todos os derivados, células da progénie dos hibridomas parentais que produzem anticorpos monoclonais específicos para NGF, ou uma porção dos mesmos.

Hibridomas que produzem os anticorpos referidos podem ser cultivados *in vitro* ou *in vivo* usando procedimentos conhecidos. Os anticorpos monoclonais podem ser isolados do meio de cultura ou de fluidos corporais, por procedimentos

convencionais de purificação de imunoglobulina tais como precipitação de sulfato de amônio, eletroforese de gel, diálise, cromatografia, e ultrafiltração, caso desejado. Atividade indesejada, caso presente, pode ser removida, por exemplo, passando a preparação sobre adsorventes feitos do agente imunogénico fixado a uma fase sólida e elutriando ou liberando os anticorpos desejados do agente imunogénico. A imunização de um animal hospedeiro com um NGF humano, ou um fragmento contendo a sequência de aminoácidos alvo conjugada a uma proteína que é imunogénica na espécie a ser imunizada, por exemplo, hemocianina de lapa, albumina sérica, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja usando um agente bifuncional ou de derivação, por exemplo éster de maleimidobenzoilo sulfossuccinimida (conjugação através de resíduos cisteína), N-hidroxissuccinimida (através de resíduos lisina), glitardeído, anidrido succínico, SOCl_2 , ou $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, onde R e R_1 são grupos alquilo diferentes, pode produzir uma população de anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais).

Caso desejado, o anticorpo antagonista anti-NGF (monoclonal ou policlonal) de interesse pode ser sequenciado e a sequência de polinucleótido pode ser então clonada num vetor para expressão ou propagação. A sequência que codifica o anticorpo de interesse pode ser mantida no vetor numa célula hospedeira e a célula hospedeira pode ser então expandida e congelada para utilização futuro. Numa alternativa, a sequência de polinucleótido pode ser usada para manipulação genética para "humanizar" o anticorpo ou para melhorar a afinidade, ou outras características do anticorpo. Por exemplo, a região constante pode ser produzida por engenharia para se assemelhar a regiões constantes humanas para evitar reação imune se o anticorpo for usado em ensaios clínicas e tratamentos em seres humanos. Pode ser desejável manipular geneticamente a

sequência de anticorpo para obter maior afinidade para NGF e maior eficácia para inibir NGF. Será evidente para um perito na especialidade que pode ser feita uma ou mais alterações de polinucleótidos para o anticorpo antagonista anti-NGF e ainda manter sua capacidade de ligação a NGF.

Há quatro etapas gerais para humanizar um anticorpo monoclonal. Estas são: (1) determinar o nucleótido e sequência de aminoácidos prevista dos domínios variáveis de cadeia leve e pesada do anticorpo de partida (2) desenhar o anticorpo humanizado, isto é, decidir qual região de estrutura de anticorpo usar durante o processo de humanização (3) as metodologias / técnicas de humanização atuais e (4) a transfeção e expressão do anticorpo humanizado. Veja-se, por exemplo, as Patentes US N° 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 uma série de moléculas de anticorpos "humanizados" que compreende um local de ligação antigénica derivado de uma imunoglobulina não humana, incluindo anticorpos quiméricos tendo regiões V de roedores ou de roedores modificados e suas regiões determinantes de complementaridade associadas (CDRs) fusionadas a domínios constantes humanos. Veja-se, por exemplo, Winter *et al.* Nature 349:293-299 (1991), Lobuglio *et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA 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 roedores enxertadas numa região de estrutura de suporte humano (FR) antes de fusão com um domínio constante de anticorpo humano apropriado. Veja-se, 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 roedores suportadas por regiões de estrutura de roedores recobertas de modo recombinante. Veja-se, por exemplo, a Publicação de Patente Europeia N°

0519596. Estas moléculas "humanizadas" são projetadas para minimizar reação imunológica indesejada contra moléculas de anticorpos anti-humanos de roedores a qual limita a duração e a eficácia de aplicações terapêuticas destas porções em recetores humanos. Por exemplo, a região constante do anticorpo pode ser produzida de tal modo que seja imunologicamente inerte (por exemplo, não inicia um processo de lise de complemento). Veja-se, por exemplo, a Publicação de Patente Internacional N° PCT/GB99/01441; o Pedido de Patente do Reino Unido N° 9809951,8. Outros métodos de humanização de anticorpos que também podem ser utilizados são descritos por Daugherty *et al.*, Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 (1991) e nas Patentes US N° 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; e 6.350.861; e na Publicação de Patente Internacional N° WO 01/27160.

Em ainda outra alternativa, anticorpos totalmente humanos podem ser obtidos usando ratinhos disponíveis comercialmente que foram produzidos para expressar proteínas imunoglobulinas humanas específicas. Animais transgênicos que são desenhados para produzir uma reação imune mais desejável (por exemplo, anticorpos totalmente humanos) ou mais robusta também podem ser usados para produção de anticorpos humanos ou humanizados. Exemplos de semelhante tecnologias são Xenomouse™ da Abgenix, Inc. (Fremont, CA) e HuMAb-Mouse® e TC Mouse™ da Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

Numa alternativa, anticorpos podem ser preparados de modo recombinante e expressos usando qualquer método conhecidos na técnica. Em outra alternativa, os anticorpos podem ser preparados de modo recombinante por tecnologia de apresentação de fago. Veja-se, por exemplo, as Patentes US N° 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; e 6.265.150; e Winter *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994). Alternativamente, a tecnologia de apresentação de fago (McCafferty *et al.*, Nature 348:552-553 (1990)) pode ser

usada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos *in vitro*, a partir de repertórios de gene de domínio variável (V) de imunoglobulina de doadores não imunizados. De acordo com esta técnica, os genes do domínio V de anticorpos são clonados na grelha ou num gene de proteína de revestimento maior ou menor de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd, e apresentados como fragmentos de anticorpos funcionais sobre a superfície da partícula de fago. Como a partícula filamentososa contém uma cópia de ADN de filamento único do genoma do fago, seleções à base das propriedades funcionais do anticorpo também resultam na seleção do gene que codifica o anticorpo apresentando estas propriedades. Portanto, o fago simula algumas das propriedades da célula B. A apresentação de fago pode ser realizada numa variedade de formatos; para revisão veja-se, por exemplo, Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Várias fontes de segmentos de V-gene podem ser usadas para apresentação de fago. Clackson *et al*, *Nature* 352:624-628 (1991) isolou uma série diversa de anticorpos antioxazolona de uma biblioteca combinatória aleatória pequena de genes V derivados dos baços de ratinhos imunizados. Um repertório de genes V de doadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos para uma série diversa de antigénios (incluindo auto-antigénios) podem ser isolados essencialmente seguindo 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 reação imune natural, genes de anticorpos acumulam mutações num alto índice (hipermutação somática). Algumas das alterações introduzidas conferirão maior afinidade, e células B apresentando imunoglobulina superficial de alta afinidade são preferencialmente duplicadas e diferenciadas durante subsequente ataque antigénico. Este processo natural pode ser simulado empregando a técnica conhecida

como "baralhamento de cadeia (chain shuffling)." Marks, *et al.*, *Bio/Technol.* 10:779-783 (1992)). Neste método, a afinidade de anticorpos humanos "primários" obtidos por apresentação de fago pode ser otimizada substituindo sequencialmente os genes de região V de cadeia pesada e leve com repertórios de variantes que ocorrem naturalmente (repertórios) de genes de domínio V obtidos de doadores não imunizados. Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpos com afinidades no intervalo pM-nM. Uma estratégia para preparar repertórios de anticorpos de fagos muito grandes (também conhecidos como "the mother-of-all libraries") foi descrita por Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266 (1993). Também pode ser usada permutação genética para derivar anticorpos humanos de anticorpos de roedores, onde o anticorpo humano tem afinidades semelhantes e especificidades para o anticorpo de roedor de partida. De acordo com este método, o qual também é referido como "impressão de epítipo", o gene do domínio V de cadeia pesada ou leve de anticorpos de roedores obtidos por técnica de apresentação de fago é substituído com um repertório de genes de domínio V humano, criando quimeras roedor-humanas. A seleção sobre antigénio resulta no isolamento de regiões variáveis humanas capazes de restaurar um local de ligação antigénica funcional, isto é, o epítipo governa (imprime) a escolha do parceiro. Quando o processo é repetido de modo a substituir o domínio V de roedor remanescente, um anticorpo humano é obtido (veja-se a Publicação de Patente Internacional N° WO 93/06213, publicada em 1 de abril de 1993). Diferentemente de humanização tradicional de anticorpos de roedores por enxerto de CDR, esta técnica proporciona anticorpos completamente humanos, os quais não têm estrutura ou resíduos CDR de origem de roedor.

É evidente que embora a discussão acima diz respeito a anticorpos humanizados, os princípios gerais discutidos são

aplicáveis para customizar anticorpos para utilização, por exemplo, em cães, gatos, primata, equinos e bovinos. Adicionalmente é evidente que um ou mais aspectos de humanização de um anticorpo descrito no presente documento, podem ser combinados, por exemplo, enxerto de CDR, mutação de estrutura e mutação de CDR.

Anticorpos podem ser preparados de modo recombinante primeiro isolando os anticorpos e células produtoras de anticorpos de animais hospedeiros, obtendo a sequência genética, e usando a sequência genética para expressar o anticorpo de modo recombinante em células hospedeiras (por exemplo, células CHO). Outro método o qual pode ser utilizado é expressar a sequência de anticorpos em plantas (por exemplo, tabaco) ou leite transgênico. Foram descritos métodos para expressar anticorpos de modo recombinante em plantas ou leite. Veja-se, 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). Métodos para preparar derivados de anticorpos, por exemplo, humanizados, de cadeia única, e etc. são conhecidos na técnica.

Técnicas de ensaios imunológicos e de classificação por citometria de fluxo tais como classificação celular ativada por fluorescência (FACS) também podem ser utilizadas para isolar anticorpos que são específicos para NGF.

Os anticorpos podem ser ligados por muitos veículos diferentes. Os veículos podem ser ativos e/ou inertes. Exemplos de veículos de conhecimento geral incluem polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, náilon, amilases, vidro, celuloses naturais e modificadas, poliacrilamidas, agaroses e magnetita. A natureza do veículo pode ser ou solúvel ou insolúvel para os fins da invenção. Os versados na técnica conhecerão outros veículos adequados para ligação de anticorpos, ou serão capazes de

determinar os mesmos, usando experimentação de rotina. Em algumas formas de realização, o veículo compreende uma porção que tem por alvo o miocárdio.

ADN que codifica os anticorpos monoclonais é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleótidos que são capazes de ligar especificamente a genes que codifica as cadeias pesada e leve dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem como uma fonte preferencial de semelhante ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser posto em vetores de expressão (tais como vetores de expressão descritos na Publicação de Patente Internacional N° WO 87/04462), os quais são então transfetados em células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que não produzem de outro modo proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Veja-se, por exemplo, a Publicação de Patente Internacional N° WO 87/04462. O ADN também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência codificante para domínios constantes de cadeia leve e pesada humanas ao invés das sequências murinas homólogas, Morrison *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851 (1984), ou ligando de modo covalente à sequência codificante de imunoglobulina toda ou parte da sequência codificante a um polipéptido não imunoglobulina. Nesta maneira, são preparados anticorpos "quiméricos" ou "híbridos" que têm a especificidade de ligação de um anticorpo anti-NGF monoclonal no presente documento.

Anticorpos antagonistas anti-NGF podem ser caracterizados usando métodos de conhecimento geral na técnica. Por exemplo, um método é identificar o epítipo ao qual ele liga, ou "mapeamento de epítipo." Há muitos métodos conhecidos na técnica para mapeamento e caracterização da localização de epítipos sobre proteínas,

incluindo solvendo a estrutura cristalina de um complexo antigénio-anticorpo, ensaios de competição, ensaios de expressão de fragmento genético, e ensaios à base de péptidos sintéticos, conforme descrito, por exemplo, no Capítulo 11 de Harlow e Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. Num exemplo adicional, o mapeamento de epítomos pode ser usado para determinar a sequência à qual se liga um anticorpo antagonista anti-NGF. O mapeamento de epítomos está disponível comercialmente a partir de várias fontes, por exemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Baixos). O epítopo pode ser um epítopo linear, isto é, contido num único trecho de aminoácidos, ou um epítopo conformacional formado por uma interação tridimensional de aminoácidos que podem não estar necessariamente contidos num único trecho. Péptidos de extensões variáveis (por exemplo, pelo menos 4 a 6 aminoácidos de extensão) podem ser isolados ou sintetizados (por exemplo, de modo recombinante) e usados para ensaios de ligação com um anticorpo antagonista anti-NGF. Em outro exemplo, o epítopo ao qual o anticorpo antagonista anti-NGF liga pode ser determinado num rastreio sistemático usando sobreposição de péptidos derivados da sequência de NGF e determinação da ligação pelo anticorpo antagonista anti-NGF. De acordo com os ensaios de expressão de fragmento genético, a estrutura de leitura aberta que codifica NGF é fragmentado ou aleatoriamente ou por construções genéticas específicas e a reatividade dos fragmentos de NGF expressos com o anticorpo a ser testado é determinada. Os fragmentos de gene podem ser produzidos, por exemplo, por PCR e em seguida transcrito e traduzido em proteína *in vitro*, na presença de aminoácidos radioativos. A ligação do anticorpo aos fragmentos de NGF marcados radioativamente é então determinada por imunoprecipitação e eletroforese de gel. Alguns epítomos também podem ser

identificados usando grandes bibliotecas de sequências de péptidos aleatórias apresentadas sobre a superfície de partículas de fagos (bibliotecas de fagos). Alternativamente, uma biblioteca definida de sobreposição de fragmentos de péptidos pode ser testada para ligação ao anticorpo de ensaio em ensaios de ligação simples. Num exemplo adicional, a mutagênese de um domínio de ligação de antígeno, experiências de permutação de domínio e mutagênese de varrimento de alanina podem ser realizados para identificar resíduos requeridos, suficientes, e/ou necessários para ligação de epítipo. Por exemplo, experiências de permutação de domínio podem ser realizadas usando um NGF mutante no qual vários fragmentos do polipéptido de NGF foram substituídos (permutados) com sequências de uma proteína intimamente relacionada, porém antígenicamente distinta (tal como outro membro da família das proteínas neurotrofinas). Avaliando a ligação do anticorpo ao NGF mutante, pode ser avaliada a importância do fragmento de NGF em particular para ligação de anticorpos.

Ainda outro método o qual pode ser usado para caracterizar um anticorpo antagonista anti-NGF é usar ensaios de competição com outros anticorpos que se sabe que ligam ao mesmo antígeno, isto é, vários fragmentos sobre NGF, para determinar se o anticorpo antagonista anti-NGF liga-se ao mesmo epítipo que outros anticorpos. Ensaios de competição são de conhecimento geral dos peritos na especialidade. Exemplos de anticorpos que podem ser usados 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 usado para expressão direta de um anticorpo antagonista anti-NGF. Um perito na especialidade está familiarizado com a administração de vetores de expressão para obter expressão de uma proteína

exógena *in vivo*. Veja-se, por exemplo, as Patentes US N° 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, pistola de partículas ou administração cateterizada, e administração tópica. Em outra forma de realização, o vetor de expressão é administrado diretamente ao gânglio ou tronco simpático, ou numa artéria coronária, aurícula, ventrículo, ou pericárdio.

Também pode ser usada a libertação orientada de composições terapêuticas que contêm um vetor de expressão, ou polinucleótidos subgenômicos. Técnicas de libertação de ADN mediada por recetores são descritas, por exemplo, em 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. USA (1990) 87:3655; Wu *et al.*, J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Composições terapêuticas que contêm um polinucleótido são administradas dentro de um intervalo de cerca de 100 ng até cerca de 200 mg de ADN para administração local num protocolo de terapêutica genética. Intervalos de concentração de cerca de 500 ng até cerca de 50 mg, cerca de 1 µg até cerca de 2 mg, cerca de 5 µg até cerca de 500 µg, e cerca de 20 µg até cerca de 100 ng de ADN também podem ser usadas durante um protocolo de terapêutica genética. Os polinucleótidos e polipéptidos terapêuticos podem ser libertados usando veículos de libertação genética. O veículo de libertação genética pode ser de origem viral ou não viral (veja-se, de modo 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 de semelhantes sequências codificantes pode ser induzida

usando promotores heterólogos ou de mamíferos endógenos. A expressão da sequência codificante pode ser ou constitutiva ou regulada.

Vetores à base de vírus para libertação de um polinucleótido desejado e expressão numa célula desejada são de conhecimento geral na técnica. Veículos à base de vírus típicos incluem, mas não estão limitados a, retrovírus recombinantes (veja-se, por exemplo, as Publicações de Patentes Internacionais N° WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; as Patentes US N° 5.219.740 e 4.777.127; a Patente da Grã-Bretanha No. 2.200.651; e a Patente Europeia N° 0 345 242), vetores à base de alfavírus (por exemplo, vetores de vírus Sindbis, vírus da floresta de Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), vírus do rio Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) e vírus da encefalite equina da Venezuela (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), e vetores de vírus adeno-associados (AAV) (veja-se, por exemplo, as Publicações de Patentes Internacionais N° WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 e WO 95/00655). Também pode ser utilizada a administração de ADN ligado a adenovírus mortos conforme descrito em Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.

Também podem ser utilizados veículos e métodos de libertação não virais, incluindo, mas não limitados a, ADN condensado policatiônico ligado ou não ligado a adenovírus morto sozinho (veja-se, por exemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); ADN ligado a ligante (veja-se, por exemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); células veículos de libertação de células eucarióticas (veja-se, por exemplo, a Patente US N° 5.814.482; as Publicações de Patentes Internacionais N° WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; e WO 97/42338) e neutralização de carga nucleica ou fusão com membranas celulares. Também pode ser utilizado ADN nu. Métodos de introdução de ADN nu típicos são

descritos na Publicação de Patente Internacional N° WO 90/11092 e na Patente US N° 5.580.859. Lipossomas que podem agir como veículos de libertação genética são descritos na Patente US N° 5.422.120; nas Publicações de Patentes Internacionais N° WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; e na Patente Europeia N° EP 0524968. Abordagens adicionais são descritas em Philip, *Mol. Cell Biol.* (1994) 14:2411, e em Woffendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91:1581.

Outros antagonistas de NGF

Antagonistas de NGF diferentes de anticorpos anti-NGF são descritos para propósitos comparativos. Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF compreende pelo menos uma molécula de sentido reverso capaz de bloquear ou reduzir a expressão de um NGF funcional. Sequências de nucleótidos do NGF são conhecidas e estão prontamente disponíveis a partir de bancos de dados disponíveis publicamente. Veja-se, por exemplo, Borsani *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 1990, 18, 4020; Número de Acesso NM 002506; Ullrich *et al.*, *Nature* 303:821-825 (1983). É rotina preparar moléculas de oligonucleótidos de sentido reverso que especificamente ligarão ARNm de NGF sem ter reação cruzada com outros polinucleótidos. Locais típicos de alvo incluem, mas não estão limitados a, o codão de iniciação, as regiões regulatórias 5', a sequência codificante e a região não traduzida 3'. Em algumas formas de realização, os oligonucleótidos têm cerca de 10 a 100 nucleótidos de extensão, cerca de 15 a 50 nucleótidos de extensão, cerca de 18 a 25 nucleótidos de extensão, ou mais. Os oligonucleótidos podem compreender modificações da estrutura principal tais como, por exemplo, ligações fosforotioato, e modificações de 2'-O açúcar de conhecimento geral na técnica. Moléculas de sentido reverso típicas incluem as moléculas de sentido reverso de NGF descritas na Publicação US N° 20010046959; veja-se também <http://www.rna-tec.com/reopair.htm>.

Em outras formas de realização, o antagonista de NGF compreende pelo menos uma molécula de sentido reverso capaz de bloquear ou reduzir a expressão de um recetor de NGF funcional (tal como TrkA e/ou p75). Woolf *et al.*, J. Neurosci. (2001) 21 (3): 1047-55; Taglialetela *et al.*, J Neurochem (1996) 66(5): 1826-35. Sequências de nucleótidos de TrkA e p75 são conhecidas e estão prontamente disponíveis em bancos de dados publicamente disponíveis.

Alternativamente, a expressão e/ou libertação de NGF e/ou a expressão de recetores de NGF pode ser reduzida usando silenciamento genético, morfolino oligonucleótidos, ARNi, ou ribozimas, métodos que são de conhecimento geral na técnica. Veja-se

<http://www.macalester.edu/~montgomery/RNAi.html>;

<http://pub32.ezboard.com/fmorpholinosfrm19.showMessage?topicID=6.topic>;

<http://www.highveld.com/ribozyme.html>.

Em outras formas de realização, o antagonista de NGF compreende pelo menos um composto inibidor de NGF. Conforme usado no presente documento, o "composto inibidor de NGF" refere-se a um composto diferente de um anticorpo anti-NGF que diretamente ou indiretamente reduz, inibe, neutraliza, ou abole a atividade biológica do NGF. Um composto inibidor de NGF deve apresentar qualquer uma ou mais das seguintes características: (a) ligação a NGF e inibição da atividade biológica de NGF e/ou de vias a jusante mediados por função de sinalização de NGF; (b) prevenção, melhora, ou tratamento de qualquer aspeto de dor (tal como dor da osteoartrite); (c) bloqueio ou redução da ativação de recetores de NGF (incluindo dimerização e/ou autofosforilação de recetor TrkA); (d) aumento da depuração de NGF; (e) inibição (redução) da síntese, produção ou libertação de NGF. Compostos inibidores de NGF típicos incluem os inibidores de NGF de molécula pequena descritos na Publicação US N° 20010046959; os compostos que inibem

ligação de NGF a p75, conforme descrito na Publicação de Patente Internacional N° WO 00/69829, e PD90780 [ácido 7-(benzolilamino)-4,9-diidro-4-metil-9-oxo-pirazolo[5,1-b]quinazolina-2-carboxílico] conforme descrito por Colquhoun *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 310(2):505-11 (2004); os compostos que inibem a ligação de NGF a TrkA e/ou p75, conforme descrito na Publicação de Patente Internacional N° WO 98/17278. Exemplos adicionais de compostos inibidores de NGF incluem os compostos descritos nas Publicações de Patente Internacional N° WO 02/17914 e WO 02/20479, e nas Patentes US N° 5.342.942; 6.127.401; e 6.359.130. Compostos inibidores de NGF típicos adicionais são compostos que são inibidores competitivos de NGF. Veja-se a Patente US N° 6.291.247. Além disso, um perito na especialidade pode preparar outros compostos inibidores de NGF de moléculas pequenas.

Em algumas formas de realização, um composto inibidor de NGF liga NGF. Locais típicos de alvo (ligação) incluem, mas não estão limitados a, a porção do NGF que se liga ao recetor TrkA e/ou recetor p75, e as porções do NGF que são adjacentes à região de ligação de recetor e as quais são responsáveis, em parte, pela forma tridimensional correta da porção de ligação de recetor. Em outra forma de realização, um composto inibidor de NGF liga um recetor de NGF (tal como TrkA e/ou p75) e inibe uma atividade biológica do NGF. Locais típicos de alvo incluem as porções de TrkA e/ou p75 que se ligam a NGF.

Em formas de realização que compreende moléculas pequenas, uma molécula pequena pode ter um peso molecular de cerca de qualquer um de 100 a 20.000 Dalton, 500 a 15.000 Dalton, ou 1000 a 10.000 Dalton. Bibliotecas de moléculas pequenas estão disponíveis comercialmente. As moléculas pequenas podem ser administradas usando quaisquer meios conhecidos na técnica, incluindo inalação, por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via

intramuscular, por via subcutânea, por via intratecal, por via intraventricular, por via oral, por via enteral, por via parentérica, por via intranasal, ou por via dérmica. Em geral, quando o antagonista de NGF de acordo com a invenção é uma molécula pequena, será administrado no índice de 0,1 a 300 mg/kg do peso do paciente dividido numa a três ou mais doses. Para um paciente adulto de peso normal, podem ser administradas doses variando de 1 mg a 5 g por dose.

Em outras formas de realização, o antagonista de NGF compreende pelo menos um análogo estrutural de NGF. "Análogos estruturais de NGF" na presente divulgação referem-se a compostos que têm uma estrutura tridimensional semelhante como parte daquela do NGF e os quais ligam a um recetor de NGF sob condições fisiológicas *in vitro* ou *in vivo*, em que a ligação pelo menos parcialmente inibe uma atividade biológica do NGF. Numa forma de realização, o análogo estrutural de NGF liga a um TrkA e/ou um p75 recetor. Análogos estruturais de NGF típicos incluem, mas não estão limitados a, os péptidos bicíclicos descritos na Publicação de Patente Internacional N° WO 97/15593; os péptidos bicíclicos descritos na Patente US N° 6.291.247; os compostos cíclicos descritos na Patente US N° 6.017.878; e péptidos derivados de NGF descritos na Publicação de Patente Internacional N° WO 89/09225. Análogos estruturais de NGF adequados também podem ser desenhados e sintetizados através de modelagem molecular de ligação de recetor de NGF, por exemplo, pelo método descrito na Publicação de Patente Internacional N° WO 98/06048. Os análogos estruturais de NGF podem ser monómeros ou dímeros / oligómeros em qualquer combinação desejada das mesmas estruturas ou de estruturas diferentes para obter efeitos biológicos e afinidades otimizados.

Em outras formas de realização, o antagonista de NGF compreende pelo menos um mutante dominante-negativo do recetor TrkA e/ou p75. Um perito na especialidade pode

preparar mutantes dominantes-negativos de, por exemplo, o recetor TrkA de tal modo que o recetor ligará o NGF e, deste modo, agirá como um "sorvedouro" para capturar NGFs. Os mutantes dominantes-negativos, no entanto, não terão a bioatividade normal do recetor TrkA na ligação a NGF. Mutantes dominantes-negativos típicos incluem, mas não estão limitados a, os mutantes descritos nas seguintes referências: Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 10884; Eide *et al.*, J. Neurosci. 1996, 16, 3123; Liu *et al.*, J. Neurosci 1997, 17, 8749; Klein *et al.*, Cell 1990, 61, 647; Valenzuela *et al.*, Neuron 1993, 10, 963; Tsoulfas *et al.*, Neuron 1993, 10, 975; e Lamballe *et al.*, EMBO J. 1993, 12, 3083. Os mutantes dominantes-negativos podem ser administrados em forma de proteína ou sob a forma de um vetor de expressão de tal modo que o mutante dominante negativo, por exemplo, recetor TrkA mutante, é expresso *in vivo*. A proteína ou vetor de expressão pode ser administrado usando quaisquer meios conhecidos na técnica, tais como por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via intramuscular, por via subcutânea, por via intratecal, por via intraventricular, por via oral, por via enteral, por via parentérica, por via intranasal, por via dérmica, ou por inalação. Por exemplo, a administração de vetores de expressão inclui administração local ou sistémica, incluindo injeção, administração oral, pistola de partículas ou administração cateterizada, e administração tópica. Um perito na especialidade está familiarizado com a administração de vetores de expressão para obter a expressão de uma proteína exógena *in vivo*. Veja-se, por exemplo, as Patentes US N° 6.436.908; 6.413.942; e 6.376.471.

Também pode ser usada a libertação orientada de composições terapêuticas que contêm um polinucleótido de sentido reverso, vetor de expressão, ou polinucleótidos subgenómicos. Técnicas de libertação de ADN mediada por

recetores são descritas, por exemplo, em 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. USA (1990) 87:3655; Wu *et al.*, J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Composições terapêuticas que contêm um polinucleótido são administradas dentro de um intervalo de cerca de 100 ng até cerca de 200 mg de ADN para administração local num protocolo de terapêutica genética. Em algumas formas de realização, também podem ser usadas intervalos de concentração de cerca de 500 ng até cerca de 50 mg, cerca de 1 µg até cerca de 2 mg, cerca de 5 µg até cerca de 500 µg, e cerca de 20 µg até cerca de 100 µg de ADN ou mais durante um protocolo de terapêutica genética. Os polinucleótidos e polipéptidos terapêuticos da presente invenção podem ser libertados usando veículos de libertação genética. O veículo de libertação genética pode ser de origem viral ou não viral (veja-se de modo 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 de semelhantes sequências codificantes pode ser induzida usando promotores e/ou intensificadores endógenos mamíferos ou heterólogos. A expressão da sequência codificante pode ser ou constitutiva ou regulada.

Vetores à base de vírus para libertação de um polinucleótido desejado e expressão numa célula desejada são de conhecimento geral na técnica. Veículos à base de vírus típicos incluem, mas não estão limitados a, retrovírus recombinantes (veja-se, por exemplo, as Publicações de Patente Internacional N° WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; as Patentes US N° 5. 219,740 e

4.777.127; a Patente da Grã Bretanha N° 2.200.651; e a Patente Europeia N° 0 345 242), vetores à base de alfavírus (por exemplo, vetores de vírus Sindbis, vírus da floresta de Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), vírus do rio Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) e vírus da encefalite equina da Venezuela (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), e vírus adeno-associado (AAV) vetores (veja-se, por exemplo, as Publicações de Patente Internacional N° WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 e WO 95/00655). Também pode ser utilizada a administração de ADN ligado a adenovírus mortos conforme descrito em Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.

Também podem ser utilizados veículos e métodos de libertação não viral, incluindo, mas não limitados a, ADN condensado policatiônico ligado ou não ligado a adenovírus morto somente (veja-se, por exemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); ADN ligado a ligante (veja-se, por exemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); células veículos de libertação de células eucarióticas (veja-se, por exemplo, a Patente US N° 5.814.482; as Publicações de Patente Internacional N° WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; e WO 97/42338) e neutralização de carga nucleica ou fusão com membranas celulares. Também pode ser utilizado ADN nu. Métodos de introdução de ADN nu típicos são descritos na Publicação de Patente Internacional N° WO 90/11092 e na Patente US N° 5.580.859. Lipossomas que podem agir como veículos de libertação genética são descritos na Patente US N° 5.422.120; nas Publicações de Patente Internacional N° WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; e na Patente Europeia N° 0524968. Abordagens adicionais são descritas em Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411, e em Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581.

Também é evidente que um vetor de expressão pode ser usado para orientar a expressão de quaisquer dos antagonistas de NGF à base de proteína descritos no

presente documento, (por exemplo, anticorpo anti-NGF, imunoadesina de TrkA, e etc.). Por exemplo, outros fragmentos de recetor TrkA que são capazes de bloquear (desde bloqueio parcial a completo) NGF e/ou uma atividade biológica de NGF são conhecidos na técnica.

Em outra forma de realização, o antagonista de NGF compreende pelo menos uma imunoadesina de TrkA. imunoadesina de TrkAs conforme usado no presente documento, referem-se a moléculas quiméricas solúveis que compreendem o domínio extracelular de um recetor TrkA e uma sequência de imunoglobulina, a qual conserva a especificidade de ligação do recetor TrkA (substancialmente conserva a especificidade de ligação do recetor trkA) e é capaz de ligar a NGF.

Imunoadesina de TrkAs são conhecidas na técnica, e foi visto que bloqueiam a ligação de NGF ao recetor TrkA. Veja-se, por exemplo, a Patente US N° 6.153.189. Brennan *et al.* relatam a administração de imunoadesina de TrkA num modelo de dor pós-cirúrgica em rato. Veja-se Society for Neuroscience Abstracts 24 (1-2) 880 (1998). Numa forma de realização, a imunoadesina de TrkA compreende uma fusão de uma sequência de aminoácidos de recetor TrkA (ou uma porção da mesma) de domínio extracelular de TrkA capaz de ligar-se a NGF (em algumas formas de realização, uma sequência de aminoácidos que substancialmente conserva a especificidade de ligação do recetor trkA) e uma sequência de imunoglobulina. Em algumas formas de realização, o recetor TrkA é uma sequência de recetor TrkA humano, e a fusão é com uma sequência de domínio constante de imunoglobulina. Em outras formas de realização, a sequência de domínio constante de imunoglobulina é uma sequência de domínio constante de imunoglobulina de cadeia pesada. Em outras formas de realização, a associação de duas fusões de cadeia pesada de imunoglobulina-recetor TrkA (por exemplo, através de ligação covalente por uma ou mais ligações dissulfureto)

resulta numa estrutura semelhante a imunoglobulina homodimérica. Uma cadeia leve de imunoglobulina pode ser adicionalmente associada a uma ou ambas as quimeras recetor TrkA- imunoglobulina no dímero ligado a dissulfureto para produzir uma estrutura homotrimérica ou homotetramérica. Exemplos de imunoadesina de TrkAs adequadas incluem as descritas na Patente US N° 6.153.189.

Em outra forma de realização, o antagonista de NGF compreende pelo menos um anticorpo anti-TrkA capaz de bloquear, suprimir, alterar, e/ou reduzir a interação física de NGF com o recetor TrkA e/ou sinalização a jusante, por meio da qual uma atividade biológica de NGF é reduzida e/ou bloqueada. Anticorpos anti-TrkA são conhecidos na técnica. Anticorpos anti-TrkA típicos incluem os descritos nas Publicações de Patente Internacional N° WO 97/21732, WO 00/73344, WO 02/15924, e a Publicação de Patente US N° 2001/0046959.

Em outra forma de realização, o antagonista de NGF compreende pelo menos um anticorpo anti-p75 capaz de bloquear, suprimir e/ou reduzir a interação física de NGF com o p75 recetor e/ou sinalização a jusante, por meio da qual uma atividade biológica de NGF é reduzida e/ou bloqueada.

Em outra forma de realização, o antagonista de NGF compreende pelo menos um inibidor de quinase capaz de inibir sinalização de quinase a jusante associada a atividade de recetor TrkA e/ou p75. Um inibidor de quinase típico é K252a ou K252b, o qual é conhecido na técnica e descrito em Knusel *et al.*, J. Neurochem. 59:715-722 (1992); Knusel *et al.*, J. Neurochemistry 57:955-962 (1991); Koizumi *et al.*, J. Neuroscience 8:715-721 (1988); Hirata *et al.*, Chemical Abstracts 111:728, XP00204135, veja-se sumário e 12th Collective Chemical Substance Index, p. 34237, c. 3 (5-7), 55-60, 66-69), p. 34238, c.1 (41-44), c.2 (25-27, 32-33), p. 3423, c.3 (48-50, 52-53); e a Patente US N°

6.306.849.

Espera-se que uma série de outras categorias de antagonistas de NGF venham ser identificadas caso buscadas pelo médico.

Identificação de antagonistas de NGF (tais como anticorpos antagonistas anti-NGF)

Antagonistas de NGF, incluindo anticorpos antagonistas anti-NGF, podem ser identificados ou caracterizados usando métodos conhecidos na técnica, por meio dos quais é detetada e/ou medida a redução, melhora, ou neutralização da uma biológica atividade de NGF. Podem ser usados métodos descritos na publicação de patente Internacional N° PCT WO 04/065560. Outro método, por exemplo, um ensaio de ativação de recetor de quinase (KIRA) descrita nas Patentes US N° 5.766.863 e 5.891.650, pode ser usado para identificar agentes anti-NGF. Este ensaio tipo ELISA é adequado para medição qualitativa ou quantitativa da ativação de quinase medindo a autofosforilação do domínio quinase de uma proteína tirosina quinase recetora (nas partes que se seguem "rPTK"), por exemplo, recetor TrkA, bem como para identificação e caracterização de antagonistas potenciais de um rPTK selecionado, por exemplo, TrkA. O primeiro estágio do ensaio envolve fosforilação do domínio quinase de um recetor de quinase, por exemplo, um recetor TrkA, em que o recetor está presente na membrana celular de uma célula eucariótica. O recetor pode ser um recetor endógeno ou ácido nucleico que codifica o recetor, ou uma construção de recetor, pode ser transformado dentro da célula. Tipicamente, uma primeira fase sólida (por exemplo, uma cavidade de uma primeira placa de ensaio) é revestida com uma população substancialmente homogénea de semelhantes células (geralmente uma linha celular de mamífero) de modo que as células aderem à fase sólida. Frequentemente, as células são aderentes e deste modo aderem naturalmente à primeira fase sólida. Se for usada uma "construção de

recetor", geralmente compreende uma fusão de um recetor de quinase e um polipéptido de etiqueta. O polipéptido de etiqueta é reconhecido pelo agente de captura, frequentemente um anticorpo de captura, na parte ELISA do ensaio. Um analisado, tal como um antagonista de NGF candidato (incluindo anticorpo antagonista anti-NGF) é em seguida adicionado junto com NGF às cavidades tendo as células aderentes, de tal modo que o recetor de tirosina quinase (por exemplo, recetor TrkA) é exposto a (ou posto em contacto com) NGF e o analito. Este ensaio possibilita identificação de antagonistas (incluindo anticorpos) que inibem a ativação de TrkA por seu NGF ligante. Depois de exposição a NGF e o analisado, as células aderentes são solubilizadas usando um tampão de lise (o qual tem um detergente solubilizante no mesmo) e suave agitação, deste modo liberando lisado celular o qual pode ser submetido à parte ELISA do ensaio diretamente, sem a necessidade de concentração ou clarificação do lisado celular.

O lisado celular preparado deste modo em seguida está pronto a ser submetido ao estágio ELISA do ensaio. Como uma primeira etapa no estágio ELISA, uma segunda fase sólida (geralmente uma cavidade de uma placa de microtítulo ELISA) é revestida com um agente de captura (frequentemente um anticorpo de captura) o qual se liga especificamente ao recetor de tirosina quinase, ou, no caso de uma construção de recetor, ao polipéptido finalizador. O revestimento da segunda fase sólida é realizado de modo que o agente de captura adere à segunda fase sólida. O agente de captura é de modo geral um anticorpo monoclonal, mas, conforme é descrito nos exemplos no presente documento, também podem ser usados anticorpos policlonais. O lisado celular obtido é em seguida exposto a, ou contactado com, o agente de captura aderente de modo que o recetor ou construção de recetor adere a (ou é capturado em) a segunda fase sólida. Em seguida é realizada uma etapa de lavagem, de modo a

remover o lisado celular não ligado, deixando o recetor ou construção de recetor capturado. O recetor ou construção de recetor aderente ou capturado é em seguida exposto a, ou contactado com, um anticorpo antifosfotirosina o qual identifica resíduos tirosina fosforilados no recetor de tirosina quinase. Numa forma de realização, o anticorpo antifosfotirosina é conjugado (diretamente ou indiretamente) a uma enzima a qual catalisa uma alteração de cor de um reagente de cor não radioativo. Por conseguinte, a fosforilação do recetor pode ser medida por uma alteração de cor subsequente do reagente. A enzima pode ser ligada ao anticorpo antifosfotirosina diretamente, ou uma molécula de conjugação (por exemplo, biotina) pode ser conjugada ao anticorpo antifosfotirosina e a enzima pode ser em seguida ligada ao anticorpo antifosfotirosina através da molécula de conjugação. Finalmente, a ligação do anticorpo antifosfotirosina ao recetor ou construção de recetor capturado é medida, por exemplo, por uma alteração de cor no reagente de cor.

Antagonistas de NGF (tais como anticorpo antagonista anti-NGF) também podem ser identificados incubando um agente candidato com NGF e monitorando qualquer uma ou mais das seguintes características: (a) ligação a NGF e inibição da atividade biológica de NGF ou vias a jusante mediadas por função de sinalização de NGF; (b) inibição, bloqueio ou redução da ativação de recetores de NGF (incluindo dimerização e/ou auto-fosforilação de TrkA); (c) aumento da depuração de NGF; (d) tratamento ou prevenção de qualquer aspeto de dor da artrite reumatoide ou dor da osteoartrite; (e) inibição (redução) da síntese, produção ou libertação de NGF. Em algumas formas de realização, um antagonista de NGF (por exemplo, um anticorpo antagonista anti-NGF) é identificado incubando um agente candidato com NGF e monitorando a ligação e/ou resultante redução ou neutralização de uma atividade biológica de NGF. O ensaio

de ligação pode ser realizado com um ou mais polipéptidos de NGF purificados, ou com células que expressam naturalmente, ou transfetadas para expressar, um ou mais polipéptidos de NGF. Numa forma de realização, o ensaio de ligação é um ensaio de ligação competitiva, onde a capacidade de um agente candidato (tal como um anticorpo) para competir com um anticorpo antagonista anti-NGF conhecido para ligação de NGF é avaliada. O ensaio pode ser realizado em vários formatos, incluindo o formato ELISA. Em outras formas de realização, um antagonista de NGF (tais como anticorpo antagonista anti-NGF) é identificado incubando um agente candidato com NGF e monitorando a ligação e inibição resultante de dimerização e/ou autofosforilação de recetor trkA.

Depois de identificação inicial, a atividade de um antagonista anti-NGF candidato (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF) pode ser adicionalmente confirmada e refinada por bioensaios, que se sabe que testam as atividades biológicas orientadas. Alternativamente, podem ser usados bioensaios para triar candidatos diretamente. Por exemplo, NGF promove uma série de alterações morfológicamente reconhecíveis em células responsivas. Estes incluem, mas não estão limitados a, promover a diferenciação de células PC12 e reforçar o crescimento de neurites a partir destas células (Greene *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 73(7):2424-8, 1976), promover o crescimento excessivo de neurite a partir de explantes de gânglios simpáticos e sensoriais responsivos (Levi-Montalcini, R. e Angelelctti, P. Nerve growth factor. Physiol. Rev. 48:534-569, 1968) e promover a sobrevivência de neurónios NGF dependentes tais como gânglio da raiz dorsal embrionária, gânglio trigeminal, ou neurónios de gânglios simpáticos (por exemplo, Chun & Patterson, Dev. Biol. 75:705-711, (1977); Buchman & Davies, Development 118:989-1001 (1993). Portanto, o ensaio para inibição da atividade biológica de

NGF acarreta cultivar células responsivas a NGF com NGF mais um analisado, tal como um antagonista de NGF candidato (incluindo anticorpo antagonista anti-NGF). Depois de um tempo apropriado a reação celular será testada (diferenciação celular, crescimento excessivo de neurite ou sobrevida celular).

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

Composições para utilização nos métodos da invenção

As composições usadas nas utilizações médicas da invenção compreendem uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF, e, em algumas formas de realização, compreendem adicionalmente um excipiente farmacologicamente aceitável. Em algumas formas de realização, a composição é para utilização em quaisquer das utilizações médicas descritas no presente documento. Exemplos de tais composições, e também como formular, também são descritos numa secção anterior e a seguir. Em outra forma de realização, a composição compreende um ou mais antagonistas de NGF. Em outra forma de realização, a composição compreende um ou mais antagonistas de NGF selecionados a partir de qualquer um ou mais dos seguintes: um antagonista (por exemplo, um anticorpo) que se liga a (interage fisicamente com) NGF, um antagonista que se liga a um recetor de NGF (tal como um recetor TrkA e/ou p75), e um antagonista que reduz (impede e/ou bloqueia) sinalização de recetor de NGF a jusante. Em ainda outras formas de realização, a composição compreende qualquer antagonista de NGF que não é uma imunoadesina de TrkA (isto é, é diferente de uma imunoadesina de TrkA). Em outras formas de

realização, a composição compreende qualquer antagonista de NGF que é diferente de um anticorpo anti-NGF. Em ainda outras formas de realização, a composição compreende qualquer antagonista de NGF que é diferente de uma imunoadesina de TrkA e diferente de um anticorpo anti-NGF. Em outras formas de realização, um antagonista de NGF inibe (reduz) a síntese, produção ou libertação de NGF. Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF liga NGF e não tem reação cruzada significativamente com neurotrofinas relacionadas (tais como NT3, NT4/5, e/ou BDNF). Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF não está associado a uma reação imune adversa. Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF é selecionado entre o grupo consistindo num anticorpo anti-NGF, uma molécula de sentido reverso dirigida para um NGF (incluindo uma molécula de sentido reverso dirigida para um ácido nucleico que codifica NGF), uma molécula de sentido reverso dirigida para um recetor de NGF (tal como TrkA e/ou p75), um composto inibidor de NGF, um análogo estrutural de NGF, uma mutação dominante-negativa de um recetor TrkA que se liga um NGF, uma TrkA imunoadesina, um anticorpo anti-TrkA, um anticorpo anti-p75 e um inibidor de quinase. Em outra forma de realização, o antagonista de NGF é um anticorpo anti-NGF. Em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF reconhece NGF humano. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é humano. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF é humanizado (tal como anticorpo E3 descrito no presente documento). Em ainda outra forma de realização, o anticorpo anti-NGF compreende uma região constante que não inicia um processo de uma reação imune indesejada ou indesejável, tal como lise mediada por anticorpo ou CCDA. Em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF compreende uma ou mais CDRs do anticorpo E3 (tais como uma, duas, três, quatro, cinco, ou, em algumas formas de realização, todas as seis

CDRs de E3).

Entende-se que as composições podem compreender mais de um antagonista de NGF. Por exemplo, uma composição pode compreender mais de um membro de uma classe de antagonista de NGF (por exemplo, uma mistura de anticorpos anti-NGF que reconhecem diferentes epítomos de NGF), bem como membros de diferentes classes de antagonistas de NGF (por exemplo, um anticorpo anti-NGF e um composto inibidor de NGF). Outras composições típicas compreendem mais de um anticorpo anti-NGF que reconhece o mesmo um ou mais epítomos, diferentes espécies de anticorpos anti-NGF que se ligam a diferentes epítomos de NGF, ou diferentes compostos inibidores de NGF.

A composição usada na presente invenção pode compreender adicionalmente veículos, excipientes, ou estabilizantes farmacologicamente aceitáveis (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover.), sob a forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Excipientes farmacologicamente aceitáveis são adicionalmente descritos no presente documento.

O antagonista de NGF e composições dos mesmos também podem ser usados em combinação com outros agentes que servem para reforçar e/ou complementar a eficácia dos agentes. Para dor da osteoartrite, antagonista de NGF pode ser administrado em combinação com um ou mais analgésicos diversos, NSAIDS, ou esteroides. Analgésicos incluem, mas não estão limitados a, acetaminofeno, tramadol, capsaicina (tópica). Exemplos de NSAIDS são salicilatos acetilados incluindo aspirina; salicilatos não acetilados incluindo salsalato, diflunisal; ácidos acéticos incluindo etodolac, diclofenaco, indometacina, cetorolac, nabumetona; ácidos propiónicos incluindo fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno, naproxeno de sódio, oxaprozina; fenamatos incluindo meclofenamato, ácido mefenâmico; fenilbutazona, piroxicam; inibidores de COX-2

incluindo celecoxib, etoricoxib, valdecoxib, rofecoxib, lumiracoxib. Um exemplo de esteroides é corticosteroides intra-articulares (IAC).

Para tratar a dor da artrite reumatoide, antagonista de NGF pode ser administrado em combinação com um ou mais analgésicos diversos, NSAIDS, corticosteroides (por exemplo, prednisona), ou outros fármacos antirreumáticos modificadores da doença. Exemplos de fármacos anti-reumáticos modificadores da doença são metotrexato, hidroxicloroquina, sulfasalazina, leflunomida, inibidores de TNF, recetor de interleuquina-1 solúvel, conjugados de ouro, agentes citotóxicos (azatiprina, ciclofosfamida, ciclosporina A).

Administração de um antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF)

O antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) pode ser administrado a um indivíduo (para artrite reumatoide e osteoartrite) através de qualquer via adequada. Deve ser evidente para a pessoa versada na técnica que não se pretende que os exemplos descritos no presente documento, sejam limitativos porém ilustrativos das técnicas disponíveis. Por conseguinte, em algumas formas de realização, o antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) é administrado a um indivíduo de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa, por exemplo, como um bolus ou por infusão contínua durante um período de tempo, por via intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, por via sublingual, intrassinovial, através de insuflação, intratecal, oral, inalação ou via tópica. A administração pode ser sistémica, por exemplo, administração intravenosa, ou localizada. Nebulizadores disponíveis comercialmente para formulações líquidas, incluindo nebulizadores de jato e nebulizadores ultrassónicos são úteis para administração. As formulações

líquidas podem ser diretamente nebulizadas e pó liofilizado pode ser nebulizado depois de reconstituição. Alternativamente, antagonista de NGF (tais como anticorpo antagonista anti-NGF) podem ser aerossolizados usando uma formulação de fluorocarbono e um inalador de dose dimensionada, ou inalada como um pó liofilizado e triturado.

Numa forma de realização, um antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF) é administrado através de técnicas de libertação local orientada ou local-específicas. Exemplos de técnicas de libertação local orientada ou local-específicas incluem várias fontes de depósitos implantáveis do antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) ou cateteres de libertação local, tais como cateteres de infusão, um cateter residente, ou um cateter de agulha, enxertos sintéticos, revestimentos adventícios, derivações e fios ou outros dispositivos implantáveis, veículos local específicos, injeção direta, ou aplicação direta. Veja-se, por exemplo, a Publicação de Patente Internacional N° WO 00/53211 e a Patente US N° 5.981.568.

Várias formulações de um antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF) podem ser usadas para administração. Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF (por exemplo, anticorpo antagonista anti-NGF) pode ser administrado puro. Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF (por exemplo, anticorpo antagonista anti-NGF) e um excipiente farmacologicamente aceitável pode ser em várias formulações.

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 dar forma ou consistência, ou agir como um diluente. Excipientes adequados incluem mas não estão limitados a

agentes estabilizantes, agentes humectantes e emulsificantes, sais para variar a osmolaridade, agentes encapsulantes, tampões, e intensificadores da penetração na pele. Excipientes bem como formulações para libertação de fármacos parentéricos e não parentéricos são determinados 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 exemplo, por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via subcutânea, por via intramuscular, e etc.). Por conseguinte, estes agentes podem ser combinados com veículos farmacologicamente aceitáveis tais como solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose, e semelhantes. O regime de dosagem em particular, isto é, dose, momento e repetição, dependerá do indivíduo em particular e do histórico médico daquele indivíduo.

Um anticorpo anti-NGF pode ser administrado usando qualquer método adequado, incluindo por injeção (por exemplo, por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via subcutânea, por via intramuscular, e etc.). Anticorpos anti-NGF também podem ser administrados através de inalação, conforme descrito no presente documento. De modo geral, para administração de anticorpos anti-NGF, uma dosagem candidata inicial pode ser cerca de 2 mg/kg. Para os fins da presente invenção, uma dosagem diária típica pode variar a partir de cerca de qualquer de 0,1 µg/kg a 1 µg/kg a 3 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Por exemplo, um anticorpo anti-NGF pode ser administrado a 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 vários dias ou mais tempo, dependendo da condição, o

tratamento é sustentado até ocorrer uma supressão de sintomas desejada ou até serem atingidos níveis terapêuticos suficientes para reduzir a dor. Um regime de dosagem típico compreende administrar uma dose inicial de cerca de 2 mg/kg, seguida por uma dose de manutenção semanal de cerca de 1 mg/kg do anticorpo anti-NGF, ou seguida por uma dose de manutenção de cerca de 1 mg/kg a cada duas semanas. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis, dependendo do padrão de decomposição farmacocinética que o médico pretende obter. Por exemplo, em algumas formas de realização, é contemplada a dosagem de uma a quatro vezes por semana. Pode ser usada dosagem ainda menos frequente. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é administrado uma vez a cada 2 semanas, a cada 3 semanas, a cada 4 semanas, a cada 5 semanas, a cada 6 semanas, a cada 7 semanas, a cada 8 semanas, a cada 9 semanas, a cada 10 semanas, a cada 15 semanas, a cada 20 semanas, a cada 25 semanas, ou mais tempo. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é administrado uma vez a cada 1 mês, a cada 2 meses, a cada 3 meses, a cada 4 meses, a cada 5 meses, a cada 6 meses, ou mais tempo. O progresso desta terapêutica é facilmente monitorizado por meio de técnicas e ensaios convencionais. O regime de dosagem (incluindo o um ou mais antagonistas de NGF usados) pode variar com o tempo.

Estudos realizados em pacientes com dor moderada a grave de osteoartrite do joelho (resumidos no Exemplo 9) demonstraram que dosagens dentro do alcance de 3 a 300 µg/kg proporcionaram alívio da dor por durações variáveis. Todas as dosagens testadas (3, 10, 30, 100, e 300 µg/kg) produziram uma redução na dor por pelo menos 7 dias; maiores dosagens resultaram em alívio prolongado da dor de pelo menos 28 dias (Figura 24). Uma dose de 100 µg/kg produziu alívio da dor por pelo menos 80 dias (Figura 25).

Em geral, quando não é um anticorpo, um antagonista de

NGF (em algumas formas de realização) pode ser administrado no índice de cerca de 0,1 a 300 µg/kg do peso do paciente dividido numa a três doses, ou conforme descrito no presente documento. Em algumas formas de realização, para um paciente adulto de peso normal, podem ser administradas doses variando a partir de cerca de 0,3 a 5,00 mg/kg. O regime de dosagem em particular, isto é, dose, momento e repetição, dependerão do indivíduo em particular e do histórico médico do indivíduo, bem como as propriedades dos agentes individuais (tais como a semivida do agente, e outras considerações de conhecimento geral na técnica).

Para os fins da presente divulgação, a dosagem apropriada de um antagonista de NGF (incluindo um anticorpo antagonista anti-NGF) dependerá do antagonista de NGF (ou composições do mesmo) utilizado, do tipo e da gravidade da dor a ser tratada, se o agente é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, terapêutica prévia, do histórico clínico do paciente e da reação ao agente, e do critério do médico assistente. Tipicamente o médico administrará um antagonista de NGF (por exemplo, anticorpo antagonista anti-NGF), até ser atingida uma dosagem que obtém o resultado desejado. A dose e/ou frequência podem variar durante o curso do tratamento.

Considerações empíricas, tais como a semivida, geralmente contribuirão para a determinação da dosagem. Por exemplo, anticorpos que são compatíveis com o sistema imunitário humano, tais como anticorpos humanizados ou anticorpos totalmente humanos, podem ser usados para prolongar a semivida do anticorpo e para evitar que o anticorpo seja atacado pelo sistema imunitário do hospedeiro. A frequência da administração pode ser determinada e ajustada durante o curso da terapêutica, e geralmente, mas não necessariamente, se baseia no tratamento e/ou na supressão e/ou melhora e/ou retardo da dor. Alternativamente, podem ser apropriadas formulações de

libertação contínua sustentada de antagonistas de NGF (por exemplo, anticorpos antagonistas anti-NGF). Várias formulações e dispositivos para obter libertação sustentada são conhecidos na técnica.

Numa forma de realização, as dosagens para um antagonista de NGF (por exemplo, anticorpo antagonista anti-NGF) podem ser determinadas empiricamente em indivíduos aos quais foram administradas uma ou mais administrações de um antagonista de NGF. Aos indivíduos são administradas dosagens incrementais de um antagonista de NGF (por exemplo, um anticorpo antagonista anti-NGF). Para avaliar a eficácia de um antagonista de NGF (por exemplo, anticorpo antagonista anti-NGF), pode ser seguido um indicador de dor.

A administração de um antagonista de NGF (por exemplo, um anticorpo antagonista anti-NGF) de acordo com o método na presente invenção pode ser contínuo ou intermitente, dependendo, por exemplo, da condição fisiológica do recetor, se a finalidade da administração é terapêutica ou profilática, e de outros fatores conhecidos dos profissionais versados. A administração de uma antagonista de NGF (por exemplo, um anticorpo antagonista anti-NGF) pode ser essencialmente contínua durante um período de tempo pré-selecionado ou pode ser numa série dose espaçada, por exemplo, ou antes, durante, ou depois do desenvolvimento da dor; antes; durante; antes e depois; durante e depois; antes e durante; ou antes, durante, e depois do desenvolvimento da dor.

Em algumas formas de realização, mais de um antagonista de NGF, tais como um anticorpo antagonista anti-NGF, podem estar presentes. Pelo menos um, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, ou mais antagonistas de NGF diferentes (por exemplo, anticorpos antagonistas anti-NGF) podem estar presentes. Geralmente, os antagonistas de NGF (tais como anticorpos

antagonistas anti-NGF) têm atividades complementares que não afetam de modo adverso umas às outras. Antagonistas de NGF também podem ser usados em combinação com outros agentes que servem para reforçar e/ou complementar a eficácia dos agentes.

Formulações terapêuticas do antagonista de NGF (por exemplo, anticorpo antagonista anti-NGF) usadas de acordo com a presente invenção são preparadas para armazenamento misturando um antagonista de NGF (por exemplo, um anticorpo) tendo o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes farmacologicamente aceitáveis opcionais (Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20^a Ed. Mack Publishing (2000)), sob a forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações utilizadas, e podem compreender tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; sais tais como cloreto de sódio; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de amônio de octadecildimetilbenzilo; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool benzílico ou butílico; alquilo parabenos, tais como metilo ou propilo parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos) ; proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros hidratos de carbono incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contraíões formadores de sais tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensioativos

não iônicos tais como TWEENTM, PLURONICSTM ou polietileno glicol (PEG).

Lipossomas que contêm o antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) são preparados por meio de métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Epstein, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); e nas Patentes US N° 4.485.045 e 4.544.545. Lipossomas com tempo de circulação reforçado são descritos na Patente US N° 5.013.556. Lipossomas particularmente úteis podem ser produzidos pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídeos que compreendem fosfatidileolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada e PEG (PEG-PE). Lipossomas são extrudados através de filtros de tamanho de poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado.

Os ingredientes ativos também podem ser capturados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de gelatina ou hidroximetilcelulose e microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respetivamente, em sistemas de libertação de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. As técnicas referidas são descritas em Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20^a Ed. Mack Publishing (2000).

Preparações de libertação sustentada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o antagonista (tal como o anticorpo), cujas matrizes estão sob a forma de artigos modelados, por exemplo, filmes, ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou 'poli(vinil álcool)), polilactidas (Patente US N°

3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e 7 etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tais como o LUPRON DEPOT TM (micro-esferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprólido), isobutirato de acetato de sacarose, e ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

As formulações a serem usadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é prontamente realizado, por exemplo, por filtração através de membranas de filtração estéreis. Composições terapêuticas de antagonista de NGF (por exemplo, anticorpo antagonista anti-NGF) são geralmente colocadas dentro de um recipiente tendo uma porta de acesso estéril, por exemplo, uma bolsa ou frasco de solução intravenosa tendo uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

As composições de acordo com a presente invenção podem estar em formas farmacêuticas unitárias tais como comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, grânulos, soluções ou suspensões, ou supositórios, para administração oral, parentérica ou rectal, ou administração por inalação ou insuflação.

Para preparar composições sólidas tais como comprimidos, o ingrediente ativo principal é misturado com um veículo farmacêutico, por exemplo, ingredientes para fabrico de comprimidos convencionais tais como amido de milho, lactose, sacarose, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio, fosfato dicálcico ou gomas, e outros diluentes farmacêuticos, por exemplo, água, para formar uma composição de pré-formulação sólida contendo uma mistura homogênea de um composto da presente invenção, ou um sal farmacêuticamente aceitável não tóxico do mesmo. Ao se referir a estas composições de pré-formulações como homogêneas, se indica que o ingrediente ativo é dispersado uniformemente por toda a composição de modo que a

composição pode ser prontamente subdividida em formas farmacêuticas unitárias igualmente eficazes tais como comprimidos, pílulas e cápsulas. Esta composição de pré-formulação sólida é em seguida subdividida em formas farmacêuticas unitárias do tipo descrito acima contendo a partir de 0,1 até cerca de 500 mg do ingrediente ativo da presente invenção. Os comprimidos ou pílulas da nova composição podem ser revestidos ou compostos de outro modo para proporcionar uma forma de dosagem proporcionando a vantagem de ação prolongada. Por exemplo, o comprimido ou pílula pode compreender uma dosagem interna e um componente de dosagem externa, o último estando sob a forma de um envoltório sobre o precedente. Os dois componentes podem ser separados por uma camada entérica que serve para resistir a desintegração no estômago e permite que o componente interno passe intacto para dentro do duodeno ou tenha a libertação retardada. Uma variedade de materiais pode ser usada para semelhantes camadas ou revestimentos entéricos, semelhantes materiais incluindo uma série de ácidos poliméricos e misturas de ácidos poliméricos com materiais tais como goma-laca, álcool cetílico e acetato celulósico.

Agentes tensioativos adequados incluem, em particular, agentes não iônicos, tais como sorbitanos de polioxietileno (por exemplo, TweenTM 20, 40, 60, 80 ou 85) e outros sorbitanos (por exemplo, SpanTM 20, 40, 60, 80 ou 85). Composições com um agente tensioativo convenientemente compreenderão entre 0,05 e 5% de agente tensioativo, e podem ser entre 0,1 e 2,5%. Será reconhecido que outros ingredientes podem ser adicionados, por exemplo manitol ou outros veículos farmacêuticamente aceitáveis, caso necessário.

Emulsões adequadas podem ser preparadas usando emulsões de gordura disponíveis comercialmente, tais como IntralipidTM, LiposynTM, InfonutrolTM, LipofundinTM e

Lipiphysan™. O ingrediente ativo pode ser ou dissolvido numa composição de emulsão pré-misturada ou alternativamente pode ser dissolvido num óleo (por exemplo, óleo de soja, óleo de açafrão, óleo de algodão, óleo de gergelim, óleo de milho ou óleo de amêndoas) e uma emulsão formada na mistura com um fosfolipídeo (por exemplo, fosfolipídeos de ovo, fosfolipídeos de soja ou lecitina de soja) e água. Será reconhecido que outros ingredientes podem ser adicionados, por exemplo, glicerol ou glicose, para ajustar a tonicidade da emulsão. Emulsões adequadas tipicamente conterão 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, particularmente 0,1 e 0,5 µm, e têm um pH dentro do intervalo de 5,5 a 8,0.

As composições de emulsões podem ser aquelas preparadas misturando um antagonista de NGF (tal como um anticorpo de factor de crescimento dos nervos) com Intralipid™ ou os componentes do mesmo (óleo de soja, fosfolipídeos de ovo, glicerol e água).

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 determinado acima. Em algumas formas de realização, as composições são administradas pela via oral ou nasal respiratória para efeito local ou sistémico. Composições em solventes farmacologicamente aceitáveis preferencialmente estéreis podem ser nebulizadas por utilização de gases. Soluções nebulizadas podem ser aspiradas diretamente do dispositivo de nebulização ou o dispositivo de nebulização pode ser fixado a uma máscara facial, dreno ou máquina de respiração por pressão positiva intermitente. Composições em solução, suspensão ou pó podem ser administradas, preferencialmente por via oral ou por via nasal, a partir

de dispositivos os quais libertam a formulação de uma maneira apropriada.

A eficácia do tratamento pode ser avaliada por métodos de conhecimento geral na técnica.

KITS QUE COMPREENDEM ANTICORPOS E POLINUCLEÓTIDOS DA DIVULGAÇÃO

A invenção também proporciona um *kit* compreendendo um anticorpo antagonista anti-NGF e instruções para administrar o anticorpo antagonista anti-NGF a um indivíduo tendo osteoartrite para utilização na melhoria da função física no indivíduo. A invenção também proporciona um *kit* compreendendo um anticorpo antagonista anti-NGF e instruções para administrar o anticorpo antagonista anti-NGF a um indivíduo tendo osteoartrite para utilização no tratamento da dor, melhoria da função física e melhoria da rigidez no indivíduo. Por conseguinte, em algumas formas de realização, os *kits* compreendem um anticorpo E3. Em algumas formas de realização, o *kit* compreende qualquer anticorpo descrito no presente documento.

Em outros aspetos, a divulgação proporciona *kits* que podem ser usados para quaisquer dos métodos descritos no presente documento, incluindo, por exemplo, para tratar um indivíduo com dor (incluindo dor pós-cirúrgica, dor da artrite reumatoide, e dor da osteoartrite). Os *kits* desta divulgação estão dentro de embalagem adequada, e opcionalmente podem proporcionar componentes adicionais tais como, tampões e instruções para utilização do anticorpo nas utilizações médicas. Em algumas formas de realização, os *kits* incluem instruções para tratar dor. Noutras formas de realização, o *kit* compreende um anticorpo antagonista anti-NGF descrito no presente documento, e instruções utilização nas utilizações médicas. Em algumas das formas de realização, o anticorpo antagonista anti-NGF é anticorpo E3.

A divulgação também proporciona *kits* que compreendem

um polinucleótido que codifica um polipéptido E3 conforme descrito no presente documento. Em algumas formas de realização, os *kits* adicionalmente compreendem instruções para utilização do polinucleótido em quaisquer dos métodos descritos no presente documento.

MÉTODOS PARA AJUSTAR A AFINIDADE DE UM ANTICORPO E MÉTODOS PARA CARACTERIZAR UMA CDR

Desenvolveu-se um novo método para caracterizar uma CDR de um anticorpo e/ou alterar (tal como por meio da melhora de) a afinidade de ligação de um polipéptido, tal como um anticorpo, denominado "mutagénese de varrimento de bibliotecas". Geralmente, a mutagénese de varrimento de bibliotecas funciona como se segue. Uma ou mais posições de aminoácidos na CDR são substituídas com dois ou mais (tais como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20) aminoácidos usando métodos reconhecidos na técnica. Isto produz pequenas bibliotecas de clones (em algumas formas de realização, uma para cada posição de aminoácido que é analisado), cada um com uma complexidade de dois ou mais membros (se dois ou mais aminoácidos são substituídos em cada posição). De modo geral, a biblioteca também inclui um clone que compreende o aminoácido nativo (não substituído). Um pequeno número de clones, por exemplo, cerca de 20 a 80 clones (dependendo da complexidade da biblioteca), de cada biblioteca é rastreado para afinidade de ligação ao polipéptido alvo, e são identificados candidatos com aumento da ligação, a mesma ligação, ligação reduzida ou nenhuma ligação. Os métodos para determinar a afinidade de ligação são de conhecimento geral na técnica. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é determinada usando análise de ressonância de plasmão superficial BIAcore, a qual deteta diferenças na afinidade de ligação de cerca de 2 vezes ou mais. BIAcore é particularmente útil quando o anticorpo de partida já liga com uma afinidade relativamente alta, por

exemplo uma K_D de cerca de 10 nM ou menos. Rastreamento usando ressonância de plasmão superficial BIAcore é descrita nos Exemplos, no presente documento.

Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é determinada usando Kinexa Biocensor, ensaios de proximidade de cintilação, ELISA, imunoenensaio ORIGEN (IGEN), extinção de fluorescência, transferência de fluorescência, e/ou apresentação de levedura. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é rastreada usando 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) com todos os 20 aminoácidos naturais usando métodos de mutagênese reconhecidos na técnica (alguns dos quais são descritos no presente documento). Isto gera pequenas bibliotecas de clones (em algumas formas de realização, uma para cada posição de aminoácido que é analisada), cada uma com uma complexidade de 20 membros (se todos os 20 aminoácidos são substituídos em cada posição).

Em algumas formas de realização, a biblioteca a ser rastreada compreende substituições em duas ou mais posições, as quais podem estar na mesma CDR ou em duas ou mais CDRs. Portanto, em algumas formas de realização, a biblioteca compreende substituições em duas ou mais posições numa CDR. Em outras formas de realização, a biblioteca compreende substituição em duas ou mais posições em duas ou mais CDRs. Em ainda outras formas de realização, a biblioteca compreende substituição em 3, 4, 5, ou mais posições, as referidas posições encontradas em duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs. Em algumas formas de realização, a substituição é preparada usando códons de baixa redundância. Veja-se, por exemplo, o Quadro 2 de Balint *et al.*, (1993) Gene 137(1):109-18).

Em algumas formas de realização, a CDR é CDRH3 e/ou

CDRL3. Em outras formas de realização, a CDR é uma ou mais de 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 estendida.

Candidatos com otimizada ligação podem ser sequenciados, deste modo identificando um mutante de substituição de CDR o qual resulta em otimizada afinidade (também denominada uma substituição "otimizada"). Por exemplo, conforme demonstrado no Exemplo 1, a utilização deste método permitiu identificação de uma única substituição a qual melhorou a ligação, mesmo quando umas 18 substituições diferentes estimadas na mesma posição de aminoácidos resultaram em nenhuma ligação (isto é, perda da função do anticorpo). Candidatos que ligam também podem ser sequenciados, deste modo identificando uma substituição de CDR a qual conserva ligação.

Em algumas formas de realização, são conduzidas múltiplas rodadas de rastreio. Por exemplo, candidatos (cada um que compreende uma substituição de aminoácido numa ou mais posição de uma ou mais CDRs) com otimizada ligação também são úteis para o desenho de uma segunda biblioteca contendo pelo menos o aminoácido original e substituído em cada posição de CDR otimizada (isto é, posição de aminoácido na CDR na qual um mutante de substituição apresentou ligação otimizada). A preparação, e rastreio ou seleção desta biblioteca são discutidas adicionalmente abaixo.

Mutagénesse de rastreio de bibliotecas também proporciona um meio para caracterizar uma CDR, na medida que a frequência de clones com ligação otimizada, a mesma ligação, ligação reduzida ou nenhuma ligação também proporciona informação referente à importância de cada posição de aminoácido para a estabilidade do complexo antigénio-anticorpo. Por exemplo, se uma posição da CDR conserva ligação quando alterada para todos os 20

aminoácidos, esta posição é identificada como uma posição que é improvável de ser necessária para ligação de antigénio. Ao invés, se uma posição de CDR conserva ligação em somente uma pequena percentagem de substituições, esta posição é identificada como uma posição que é importante para a função de CDR. Portanto, os métodos de mutagénese de rastreio de bibliotecas geram informação referente às posições nas CDRs que podem ser alteradas para muitos aminoácido diferentes (incluindo todos os 20 aminoácidos), e posições nas CDRs as quais não podem ser alteradas ou as quais somente podem ser alteradas para uns poucos aminoácidos. Este aspeto é discutido e exemplificado no Exemplo 1.

Em algumas formas de realização, candidatos com otimizada afinidade são combinados numa segunda biblioteca, a qual inclui o aminoácido otimizado, o aminoácido original nesta posição, e pode incluir adicionalmente substituições adicionais nesta posição, dependendo da complexidade da biblioteca que é desejada, ou permitida usando o método de rastreio ou seleção desejado. Além disso, caso desejado, a posição do aminoácido adjacente pode ser randomizado para pelo menos dois ou mais aminoácidos. A randomização de aminoácidos adjacentes pode permitir flexibilidade conformacional adicional no CDR mutante, o qual pode, por sua vez, permitir ou facilitar a introdução de um grande número de mutações otimizadas. Em algumas formas de realização, a biblioteca também compreende substituição nas posições que não mostram otimizada afinidade na primeira rodada de rastreio.

A segunda biblioteca é rastreada ou selecionada para membros da biblioteca com afinidade de ligação otimizada e/ou alterada usando qualquer método conhecido na técnica, incluindo rastreio usando análise de ressonância de plasmão superficial BIAcore, e seleção usando qualquer método conhecido na técnica para seleção, incluindo apresentação

de fago, apresentação de levedura, e apresentação de ribossoma.

Vantagens dos métodos para ajustar a afinidade de um anticorpo e caracterizar um CDR

Os métodos são úteis para pré-rastreamento de posições de aminoácido de CDR de modo a identificar substituições de aminoácidos que melhoram a ligação ou conservam a ligação. A pré-identificação de importantes resíduos, substituições que melhoram a ligação e/ou substituições que conservam a função de anticorpos permite eficiente desenho e rastreamento de uma biblioteca de maturação de afinidade.

O presente método também é útil para caracterizar um CDR, e proporciona informação completa referente à importância de cada posição de aminoácido numa CDR para ligação a antígeno. O presente método também pode ser usado para identificar substituições que melhoram a ligação.

A utilização de pequenas bibliotecas, nas quais cada posição pode ser randomizada (em algumas formas de realização, uma de cada vez), permite rastreamento de mutantes de substituição usando métodos sensíveis tais como BIAcore os quais proporcionam informação cinética pormenorizada. Métodos de rastreamento geralmente não são práticos quando são rastreadas bibliotecas maiores. Ao invés, métodos de seleção, tais como apresentação de fago, apresentação de levedura, e apresentação de ribossoma, são comumente usados para identificar clones que conservam ligação, apresentação de fago e ensaios ELISA podem depender fortemente da concentração da amostra de proteínas preparada a partir do clone, e portanto tendem a ser fortemente tendenciosos para clones que têm aumento da expressão, aumento da estabilidade, ou redução da toxicidade, ao invés de identificar clones com aumento da afinidade de ligação. Além disso, diferenças no nível de expressão dos clones podem mascarar pequenas melhoras na

afinidade de ligação. Estas desvantagens são particularmente agudas quando um anticorpo com alta afinidade de ligação é usado como a material de partida, porque devem ser usados níveis muito baixos de antigénio de modo à rastreio ser suficientemente restrigente.

Em contraste, os métodos da divulgação, tais como randomização em cada posição (em algumas formas de realização, uma posição de cada vez), permite introdução e caracterização do efeito da substituição de, por exemplo, todos os 20 aminoácidos numa dada posição. Esta análise proporciona informação quanto a como muitas substituições numa dada posição são toleradas (isto é, conservam ligação de anticorpo), a qual por sua vez, proporciona informações relativas à importância de cada aminoácido para a função do anticorpo. Além disso, podem ser identificadas substituições que resultam em ligação optimizada, mesmo sob circunstâncias nas quais muitas ou a maior parte das substituições numa dada posição produzem anticorpos não funcionais (não ligantes). Em contraste, mutagénesis de varrimento de alanina, a qual é comumente usada para identificar posições de CDR importantes, proporciona informação relativa a se a substituição da alanina permite ou evita a ligação. Geralmente, posições nas quais uma substituição de alanina evita ligação são removidas da biblioteca de maturação de afinidade. Em muitos casos, no entanto, a alanina pode ser um substituto insatisfatório na posição de CDR.

Os presentes métodos também permitem identificação e caracterização do efeito de mutações de CDR única. Em contraste, métodos tais como apresentação de fago introduzem e selecionam muitas mutações simultaneamente, e deste modo aumentam potencialmente o risco de que mutações positivas serão mascaradas pela presença de uma mutação prejudicial presente num clone em particular.

Os presentes métodos também são úteis para melhorar a

afinidade ao mesmo tempo que conservando a especificidade de ligação do anticorpo original (de partida), à medida que os presentes métodos permitam identificação de pequenos números de mutações (por exemplo, 1, 2, 3, 4, ou 5 mutações numa única CDR) que resultam em otimizada afinidade de ligação. Em contraste, métodos tais como apresentação de fago tipicamente melhoram a afinidade de ligação usando múltiplas mutações de um a vez, as quais podem resultar em mudança da especificidade do anticorpo e/ou aumento indesejável da reatividade cruzada.

Os exemplos seguintes são proporcionados para ilustrar, mas não limitar, a invenção.

EXEMPLOS

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

A. Métodos gerais

Foram usados os seguintes métodos gerais neste exemplo.

Produção de biblioteca

Bibliotecas foram geradas por mutagênese de cassete de PCR com oligonucleótidos degenerados conforme descrito em Kay *et al.* (1996), Phage display of peptides and proteins laboratory manual, San Diego, Academic Press (veja-se, páginas pg 277-291). O codão de dopagem NNK foi usado para randomizar uma posição de aminoácido para incluir 20 aminoácidos possíveis. Para randomizar uma posição de aminoácido para incluir somente um subgrupo de aminoácidos com propriedades específicas, codões de dopagem foram usados conforme descrito em Balint *et al.*, (1993) Gene 137(1):109-18). Foi realizada mutagênese local dirigida usando PCR recombinante conforme descrito em Innis *et al.*, (1990) PCR protocols: A guide to methods and applications (veja-se, pp. 177-183).

Preparação de Fab em pequena escala

A expressão em pequena escala em placas de 96

cavidades foi otimizada para rastreamento de bibliotecas de Fab. Iniciando a partir de *E. coli* transformada com uma biblioteca de Fab, foram escolhidas colônias para inocular tanto uma placa mestre (agar LB+Ampicilina (50 µg/ml) + 2% de Glicose) e uma placa de trabalho (2 ml/poço, 96 poço/placa que contém 1,5 ml de LB+Ampicilina (50 µg/ml) + 2% de Glicose). Ambas as placas foram cultivadas a 30 °C por 8-12 horas. A placa mestre foi armazenada a 4 °C e as células da placa de trabalho foram sedimentadas a 5000 rpm e ressuspensas com 1 ml de LB+Ampicilina (50 µg/ml)+ 1 mM de IPTG para induzir a expressão de Fabs. As células foram colhidas por centrifugação depois de tempo de expressão de 5 h a 30 °C, em seguida ressuspensas em 500 µL de tampão HBS-EP (tampão de 100 mM de HEPES pH 7,4, 150 mM de NaCl, 0,005% de P20, 3 mM de EDTA). Foi obtida lise de células ressuspensas em HBS-EP por um ciclo de congelamento (-80 °C) em seguida degelando a 37 °C. Os lisados celulares foram centrifugados a 5000 rpm por 30 min para separar fragmentos celulares de sobrenadantes contendo Fabs. Os sobrenadantes foram em seguida injetados no equipamento de ressonância de plasmão BIAcore para obter informação de afinidade para cada Fab. Clones que expressam Fabs foram resgatados da placa mestre para sequenciar o ADN e para produção de Fab em grande escala e caracterização pormenorizada conforme descrito a seguir.

Preparação de Fab em grande escala

Para obter parâmetros cinéticos pormenorizados, Fabs foram expressos e purificados de grandes culturas. Frascos de Erlenmeyer contendo 200 ml de LB+Ampicilina (50 µg/ml) + 2% de Glicose foram inoculados com 5 ml de cultura de um dia para o outro de um clone de *E. coli* expressando Fab selecionado. Os clones foram incubados a 30 °C até uma OD_{550nm} de 1,0 ser atingida e em seguida induzidos substituindo o meio por 200 ml, de LB+Ampicilina (50 µg/ml) + 1 mM de IPTG. Depois de tempo de expressão de 5 horas a

30 °C, as células foram sedimentadas por centrifugação, em seguida ressuspensas em 10 ml de PBS (pH 8). A lise das células foi obtida por dois ciclos de congelamento / descongelamento (a -80 °C e 37 °C, respectivamente). O sobrenadante dos lisados celulares foi carregado sobre colunas de Ni-NTA superflow sepharose (Qiagen, Valencia, CA) equilibradas com PBS, pH 8, em seguida lavadas com 5 volumes de coluna de PBS, pH 8. Fabs individuais eluídos em diferentes frações com PBS (pH 8) + 300 mM de Imidazol. Frações que contêm Fabs foram reunidas e dialisadas em PBS, em seguida quantificadas por ELISA antes de caracterização de afinidade.

Preparação de anticorpo total

Para expressão de anticorpos totais, regiões variáveis de cadeia pesada e leve foram clonados em 2 vetores de expressão de mamíferos (Eb.911.E3 ou Eb.pur.911.3E para cadeia leve e Db.911.3E para cadeia pesada; descritos no presente documento) e transfetados usando lipofectemina em células HEK 293 para expressão transitória. Os anticorpos foram purificados usando proteína A usando métodos padrão.

Ensaio Biacore

As afinidades de Fabs anti-NGF e anticorpos monoclonais foram determinadas usando o sistema de ressonância de plasmão superficial BIAcore3000™ (SPR) (BIAcore, INC, Piscaway NJ). Chips CM5 foram ativados com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropilo)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. NGF humano foi diluído em 10 mM de acetato de sódio pH 4,0 e injetado sobre o chip ativado numa concentração de 0,005 mg/ml. Usando tempo de fluxo variável através dos canais de chips individuais, foram obtidos dois intervalos de densidade de antigénio: 100 a 200 unidades de resposta (RU) para estudos cinéticos pormenorizados e 500 a 600 RU para ensaios de rastreio. O chip foi bloqueado com etanolamina. Estudos de regeneração

mostraram que uma mistura de tampão de elutriação Pierce (Produto N° 21004, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) e 4 M de NaCl (2:1) removeu de modo eficaz o Fab ligado ao mesmo tempo mantendo a atividade de hNGF sobre o chip por mais de 200 injeções. Tampão HBS-EP (0,01 M de HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% de Tensioactivo P29) foi usado como tampão de funcionamento para todos os ensaios BIAcore.

Ensaio de rastreio

Um ensaio de rastreio BIAcore foi otimizado para determinar a afinidade de clones Fab de bibliotecas. Os sobrenadantes de pequenos Usados de cultura foram injetados em 50 μ l/min por 2 min. Foram usados tempos de dissociação de 10 a 15 minutos para determinação de um único índice de dissociação exponencial (K_{off}) usando *software* de BIAevaluation. Amostras que mostraram índices K_{off} dentro do mesmo alcance que o modelo usado para criar a biblioteca (clone 8L2-6D5, K_{off} 1×10^{-3} s⁻¹) foram injetados para confirmação e tempos de dissociação de até 45 min foram permitidos para obter melhores valores de K_{off} . Clones apresentando valores otimizados de (menores) K_{off} foram expressos em grande escala e parâmetros cinéticos totais, k_{on} e K_{off} , foram determinados sobre proteína purificada. O ensaio foi capaz de detetar diferenças em afinidade que foram de cerca de 2 vezes ou maiores.

Ensaio de determinação de afinidade

Diluições seriais (0,1-10x K_D estimada) de amostras de Fab purificadas foram injetadas por 1 min a 100 μ L/min e foram permitidos tempos de dissociação de até 2h. As concentrações das proteínas Fab foram determinadas por ELISA e/ou eletroforese SDS-PAGE usando como um padrão um Fab de concentração conhecida (conforme determinado por análise de aminoácidos). Os índices de associação cinética (k_{on}) e índices de dissociação (K_{off}) foram obtidos simultaneamente por meio do ajuste dos dados para um modelo

de ligação de Langmuir a 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) usando o programa de BIAevaluation. Os valores da constante de dissociação de equilíbrio (K_D) foram calculados como K_{off}/k_{on} .

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

O anticorpo antagonista anti-NGF de ratinho, 911 (veja-se Hongo *et al.*, (2000) *Hybridoma* 19(3):215-227) foi selecionado por humanização e maturação de afinidade. Mab 911 liga NGF humano e de rato com alta afinidade e não apresenta reatividade cruzada significativa com as neurotrofinas NT3, NT4/5 ou BDNF. Veja-se Hongo, *id.* A afinidade do fragmento Fab clivado com papaína de ratinho Mab 911 foi determinada usando análise BIAcore conforme descrito acima. O fragmento Fab clivado com papaína de Mab 911 de ratinho ligou NGF humano com uma K_D de cerca de 10 nM.

Humanização e maturação de afinidade foram conduzidas em várias etapas, como se segue:

(1) Preparação de modelo enxertado com CDR. As CDRs estendidas de cadeia leve do anticorpo 911 (isto é, incluindo tanto as regiões CDR de Kabat e de Chothia) foram enxertadas nas sequências aceitadoras da linha germinal humana 08 com JK2 e as CDRs de cadeia pesada estendidas do anticorpo 911 foram enxertadas na sequência aceitadora da linha germinal humana VH4-59 com JH4. As sequências de aminoácidos das sequências aceitadoras da linha germinal humana são mostradas nas Figuras 1A e 1B. A numeração de aminoácidos é sequencial. Usando as estruturas de proteína mencionadas acima foram desenhadas sequências de ADN para genes sintéticos que codificam a estrutura humana com as CDRs murinas. Estes domínios variáveis humanizados de cadeia pesada e leve foram denominados hVH e hVL respectivamente. Os códons foram otimizados para *E. coli* e

utilização em hamster. Vários oligonucleótidos de sobreposição (69 a 90 bases de extensão) estendendo-se toda a extensão do hVL e hVH com dois iniciadores flanqueantes curtos para cada cadeia foram usados para sintetizar separadamente os dois genes por PCR recursiva essencialmente conforme descrito em Prodromou *et al.*, (1992) *Protein Eng* 5(8): 827-9. Fragmentos de ADN resultantes da extensão correta foram purificados por gel e em seguida clonados num plasmídeo de expressão bicistrônico de *E. coli* (resistente a ampicilina). A expressão dos anticorpos estava sob controlo de um promotor lacZ indutível por IPTG semelhante ao descrito em Barbas (2001) *Phage display: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press (veja-se Vector pComb3X, na pg 2.10), no entanto, modificações incluíram adição e expressão dos seguintes domínios adicionais: o domínio constante de cadeia leve Capa humano (veja-se N° de Acesso do GenBank CAA09181) e o domínio constante CHI de imunoglobulina humana IgG2a (N° de Acesso do GenBank P01859).

As sequências de aminoácidos das regiões variáveis do anticorpo enxertado com CDR (também denominado o "modelo"), denominado 8L2-4D5, também são mostradas nas Figuras 1A e 1B. A afinidade de 8L2-4D5 foi determinada usando análise BIAcore conforme descrito acima. 8L2-4D5 ligou-se a NGF humano com uma Kd de cerca de 38 nM.

(2) Introdução de uma mutação de ponto na sequência de estrutura. A substituição V71K foi introduzida na cadeia pesada enxertada com CDR usando mutagénese local dirigida por PCR recombinante conforme descrito em Innis *et al.*, (1995) *PCR strategies*. San Diego, Academic Press. Esta substituição substituiu o resíduo de estrutura humana com o resíduo de estrutura 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 mostrada na Figura 1A. A afinidade de 8L2-6D5 foi determinada usando análise BIAcore conforme descrito acima. O fragmento Fab de 8L2-6D5 ligou NGF humano com uma Kd de cerca de 15 nM. 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 (veja-se Al-Lazikani *et al* (1997) *J. Mol. Biol.* 273(4):927-48); e submetidas a randomização como se segue. Duas bibliotecas foram preparadas contendo as mutações de cadeia leve ou mutações de cadeia pesada mostradas no Quadro 2, e a CDR L3 enxertada (de ratinho) ou CDR H3, respectivamente, usando mutagênese de cassete de PCR com oligonucleótidos degenerados conforme descrito em Kay *et al.* (1996), *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*, San Diego, Academic Press, usando codões de dopagem conforme descrito em Balint *et al.*, (1993) *Gene* 137(1):109-18). Geralmente, os resíduos aminoácidos foram alterados para resíduos que são mais comuns em anticorpos humanos, com base em alinhamentos das sequências de aminoácidos de cadeia pesada e de cadeia leve do anticorpo 911 com sequências de anticorpo de linha germinal humana. O resíduo de aminoácido tipo selvagem (não substituído) também foi representado na biblioteca com a exceção do resíduo CDR H2 50, uma metionina, na qual a metionina tipo selvagem não estava representada na biblioteca. Resíduos metionina são submetidos a oxidação; portanto, espera-se que a substituição do resíduo melhore a estabilidade do anticorpo resultante. As bibliotecas de Fabs foram clonadas no vetor pComb3X mais as regiões CH1 e Ck humanas, conforme descrito acima.

Quadro 2:

1. *Biblioteca H1/H2 de cadeia pesada:*

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 L1/L2 de cadeia leve*

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 adicionalmente emparelhada com a cadeia leve ou pesada enxertada com CDR correspondente (por exemplo, a biblioteca H1/H2 foi emparelhada com cadeia leve enxertada com CDR), o anticorpo foi expresso, e a afinidade a NGF

humano dos clones individuais foi rastreada usando o sistema de ressonância de plasmão superficial (SPR) BIACORE (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ) de acordo com as instruções do fabricante e conforme descrito acima. Foram determinados K_{off} , k_{on} e K_D . Clones de anticorpos foram classificados com base nos índices de K_{off} , uma vez que geralmente a maior parte das variações na afinidade é vista nos índices de K_{off} , e adicionalmente porque os índices de K_{off} são independentes da concentração de anticorpos.

A sequência de clones que se ligou foi determinada e a sequência de clones que se ligou é mostrada no Quadro 3.

Quadro 3: Sequências de aminoácidos L1 e L2, sequências de aminoácidos H1 e H2, e dados cinéticos para clones que se ligaram depois do rastreamento de afinidade de clones das bibliotecas H1/H2 ou L1/L2.

| Dados cinéticos de 1-2 mutantes de CDR | | | | |
|--|---------------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------|
| Clones de biblioteca de cadeia leve Emparelhados com cadeia pesada 8L2 | sequência de AA CDRL1 | sequência de AA CDRL2 | K_{off} (s ⁻¹) | * k_d (nM) |
| 8L2-6D5 (controle) | RASQDISNHLN (SEQ ID NO: 12) | YISRFHS (SEQ ID NO: 13) | **1e-3 | 25 |
| L129 | RASQISISNNLN (SEQ ID NO: 18) | YTSRFHS (SEQ ID NO: 19) | 4,5e-4 | 11 |
| L208 | RASQYISNHLN (SEQ ID NO: 20) | YTSRFHS (SEQ ID NO: 21) | 4,6e-4 | 11 |
| L97 | RASQISISNQLN (SEQ ID NO: 22) | YVSRFHS (SEQ ID NO: 23) | 5,6e-4 | 14 |

| Dados cinéticos de 1-2 mutantes de CDR | | | | |
|--|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------|----------|
| L81 | RAFQAINQLN (SEQ ID NO: 24) | YISRFHT (SEQ ID NO: 25) | 7,4e-4 | 18 |
| L6 | RAFQISINQLN (SEQ ID NO: 26) | YASRFHS (SEQ ID NO: 27) | 8,2e-4 | 20 |
| Clones de biblioteca de cadeia pesada Emparelhados com Cadeia leve 6D5 | sequência de AA CDRH1 | sequência de AA CDRH2 | K_{off} (s-1) | *Kd (nM) |
| 8L2-6D5 (controlo) | GFSLIGYDIN (SEQ ID NO: 9) | MIWGDGTTDYNALS (SEQ ID NO: 10) | 1e-3 | 25 |
| H109 | GFSLIGYDSN (SEQ ID NO: 28) | IIWGDGTTDYNALS (SEQ ID NO: 29) | 1,6e-4 | 4 |
| Dados cinéticos de 1-2 mutantes de CDR | | | | |
| H19 | GFSLIGYDLN (SEQ ID NO: 30) | IIWGDGTTDYNASV (SEQ ID NO: 31) | 2,4e-4 | 6 |
| H222 | GFSLIGYDVT (SEQ ID NO: 32) | GIWGDGTTDYNASV (SEQ ID NO: 33) | 3,8e-4 | 9,5 |
| H225 | GFSLIGYDVT (SEQ ID NO: 34) | GIWGDGTTDYNSSV (SEQ ID NO: 35) | 3,8e-4 | 9,5 |

| Dados cinéticos de 1-2 mutantes de CDR | | | | |
|--|----------------------------|---------------------------------|---------|------|
| H18 | GFSLIGYDAT (SEQ ID NO: 36) | GIWGDGTTDYN SAV (SEQ ID NO: 37) | 4,2e-4 | 10,5 |
| H9 | GFSLIGYDVS (SEQ ID NO: 38) | IIWGDGTTDYN SSV (SEQ ID NO: 39) | 4,1e-4 | 10,2 |
| H227 | GFSLIGYDIS (SEQ ID NO: 40) | QIWGDGTTDYN SSV (SEQ ID NO: 41) | 5,4e-4 | 13,5 |
| H17 | GFSLIGYDAS (SEQ ID NO: 42) | GIWGDGTTDYN SSV (SEQ ID NO: 43) | 6,1 e-4 | 15,2 |
| H28 | GFSLIGYDST (SEQ ID NO: 44) | SIWGDGTTDYN SAL (SEQ ID NO: 45) | 7,5e-4 | 18,7 |
| <p>AA em negrito foram randomizados conforme indicado acima *KD calculada usando $k_{on} 4e4 M^{-1}s^{-1}$ **Por conveniência, "e" conforme usado no presente documento, denota "x10." Portanto, 4e4 de modo intercambiável significa 4×10^4.</p> | | | | |

CDRs contendo as seguintes substituições conservaram a ligação:

CDR-H1

I34: 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.

151:1, T, V, A, ligados.

F54 : F ligado

S56: S e T ligados

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 (sem alteração)

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

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

CDR-L2: Y50Y (sem alteração); 151T; F54F (sem alteração); S56S (sem alteração)

Estas mutações foram combinadas (por meio da amplificação das cadeias H e L por PCR, cortando os produtos de PCR e vetor (pRN8) com enzima de restrição e realizando uma ligação de 3 fragmentos) num único clone, denominado H19-L129, o qual também incluiu as CDRs H3 e L3 enxertadas. A sequência das regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve de H19- L129 é mostrada nas Figuras 1A e 1B, e o Quadro 4 mostra a sequência de aminoácidos das CDRs L1, L2, H1 e H2. H19-L129 ligou NGF com uma KD de cerca de 1 nM, conforme determinado usando análise BIAcore conforme descrito no presente documento.

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

| Clone de combinação: mutações em CDRs H1, H2, L1, L2 | CDRL1 CDRH1 sequência de AA | CDRL2 CDRH2 sequência de AA | K_{off} (s ⁻¹) | * K_D (nM) |
|---|---|--|------------------------------|--------------|
| H19-L129 | CDR-L1: RASQISISNNLN (SEQ ID NO: 18) CDR H1: GFSLIGYDLN (SEQ ID NO: 30) | CDRL2: YTSRFHS (SEQ ID NO: 19) CDR-H2: IIWGDGTTDYN SAV (SEQ ID NO: 31) | 1,1 e-4 | 3,5 |
| *KD calculada usando k_{on} 4e4 M ⁻¹ s ⁻¹ | | | | |

(4) Maturação por afinidade de CDRs H3 e L3. A maturação de afinidade das CDRs H3 e L3 foi realizada em duas etapas. Primeiro, num processo denominado "mutagénese de varrimento de bibliotecas", cada resíduo de aminoácido em H3 e L3 foi individualmente pré-rastreado de modo a identificar posições de aminoácido nas quais uma mutação resultou em aumento da afinidade de ligação para NGF humano. Com base nos resultados da mutagénese de varrimento de bibliotecas (também denominada "análise por randomização de biblioteca pequena"), um subgrupo de posições de aminoácidos em H3 e L3 foram selecionadas para preparação da biblioteca de maturação de afinidade, e a biblioteca de maturação de afinidade foi rastreada para afinidade a NGF humano usando análise BIAcore conforme descrito no presente documento. Reconhece-se que estas técnicas podem ser aplicadas de modo geral.

(a) Mutagénese de varrimento de bibliotecas

Cada posição de aminoácido nas CDRs H3 e L3 foi individualmente pré-rastreada para substituições as quais

resultaram em aumento da afinidade de ligação a NGF humano. A frequência das substituições de aminoácidos em qualquer dada posição que resultou em ligação otimizada, na mesma ligação, pior ligação ou nenhuma ligação proporcionou informação relativa a posições nas CDRs que podem ser alteradas para muitos aminoácidos diferentes (incluindo todos os 20 aminoácidos), e posições nas CDRs as quais não podem ser alteradas ou as quais podem ser somente alteradas por uns poucos aminoácidos. Também foram identificadas substituições de aminoácidos resultando em aumento da afinidade de ligação. Com base nos resultados deste rastreio, um subgrupo de posições de aminoácido nas CDRs H3 e L3 foram selecionadas para preparação de uma biblioteca de maturação de afinidade.

Foram preparadas bibliotecas de Fab individuais nas quais cada aminoácido das CDRs L3 e H3 foi randomizado para todos os 20 aminoácidos, um de cada vez, resultando em várias (5 bibliotecas para a cadeia leve 13 bibliotecas para a cadeia pesada) pequenas bibliotecas, cada com uma complexidade de 20 possibilidades de aminoácidos em cada posição de aminoácido. Em todos os casos, o aminoácido nativo (isto é, inalterado) foi representado na biblioteca. As bibliotecas foram preparadas por mutagênese de cassette de PCR com oligonucleótidos degenerados conforme descrito em Kay *et al.* (1996), *Phage display of Peptides and Proteins: a laboratory manual*, San Diego, Academic Press, usando o codão de dopagem NNK para randomizar uma posição de aminoácido para incluir 20 aminoácidos possíveis. O 8L2-6D5 (o anticorpo enxertado com CDR, tendo a mutação de estrutura V71K) serviu como o modelo para construção da biblioteca porque a menor afinidade do anticorpo enxertado com CDR permitiu detecção mais fácil de diferenças na afinidade em mutantes H3 e L3 durante o rastreio. Portanto, cada membro de uma biblioteca continha uma CDR3 (ou H3 ou L3) com uma substituição de aminoácido, e 5 CDRs

enxertadas.

20 a 80 clones de cada biblioteca pequena foram rastreados usando análise BIAcore conforme descrito no presente documento. As amostras foram analisadas simultaneamente por BIAcore por afinidade de ligação a NGF num canal do chip BIAcore e para presença de Fab por ligação a um anticorpo penta- histag em outro canal do chip sensor, para detetar a etiqueta his no C terminal da cadeia pesada. Clones que expressavam proteína foram classificados como tendo a mesma afinidade, pior afinidade, melhor afinidade ou nenhuma ligação, usando K_{off} para classificar: Os resultados desta análise são mostrados no Quadro 5.

Quadro 5. Clones que expressaram proteína foram classificados como tendo a mesma afinidade, pior afinidade, melhor afinidade ou nenhuma ligação, com base na Koff.

| mutação | melhor 1e-3< | mesmo > 1e-3, 2e-3< | Pior > 2e-3 | Nenhuma ligação | Percentagem de AAs que conservam 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% |
| H_Y100X | | 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% |

| mutação | melhor 1e-3< | mesmo > 1e-3, 2e-3< | Pior > 2e-3 | Nenhuma ligação | Percentagem de AAs que conservam a capacidade de ligação |
|---------|-----------------|---------------------------|----------------|--------------------|--|
| H_S105X | 10% | 25% | 26% | 39% | 35% |
| H_Y106X | | 75% | 25% | | 75% |
| H_Y107X | | 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 otimizada afinidade foi determinada, revelando a frequência e a identidade de substituições de aminoácidos que resultaram em aumento da afinidade. Além disso, uns poucos clones que conservaram uma afinidade semelhante ao clone 8I2-6D5 foram selecionados a partir de cada biblioteca, de modo a determinar substituições de sequências de aminoácidos que foram permitidas numa dada posição, muito embora a substituição não tenha necessariamente aumentado a afinidade de ligação. Os resultados desta análise são resumidos no Quadro 6.

Quadro 6.

| mutações CDR H3 | K_{off} (s-1) | K_d^* (nM) |
|---|-----------------|--------------|
| (modelo 8L2-6D5, incluindo anticorpo 911 CDR-H3 sequência de aminoácidos: GGYYYGTSYYFDY (SEQ ID NO: 11) | 1E-3 | 25 |
| 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 |

| mutações CDR H3 | K_{off} (s ⁻¹) | K_d^* (nM) |
|---|------------------------------|--------------|
| (modelo 8L2-6D5, incluindo anticorpo 911 CDR-H3 sequência de aminoácidos: GGYYYGTSYYFDY (SEQ ID NO: 11) | 1E-3 | 25 |
| 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 |
| mutações CDR L3 | K_{off} (s ⁻¹) | K_d (nM) |
| (modelo 8L2-6D5, incluindo CDR-L3 sequência de aminoácidos (não substituídos) selvagem :QQSKTLPYT (SEQ ID NO: 14) | 1E-3 | 25 |
| S91E | 2,5E-4 | 6 |
| Y96R | 1,7E-3 | 42 |
| *KD calculada usando k_{on} 4e4 M ⁻¹ s ⁻¹ | | |

Várias mutações resultaram em aumento da afinidade de ligação. Pelo menos as seguintes mutações resultaram em afinidade de ligação significativamente aumentada comparada com o modelo 8L2-6D5: (H_Y101W (CDR sequência GGYWYGTSYYFDY (SEQ ID NO: 46)); H_S105A (CDR sequência GGYYYGTAYYFDY (SEQ ID NO: 47)); H_S105T (CDR sequência GGYYYGTTYFDY (SEQ ID NO: 48)); H_G103A (CDR sequência GGYYYATSYYFDY (SEQ ID NO: 49); e L_S91E (CDR sequência QQEKTLPYT (SEQ ID NO: 50)).

Os resultados desta experiência foram usados para orientar a seleção de posições de aminoácido para produção

das bibliotecas de maturação de afinidade.

Esta experiência também proporcionou informação relativa à frequência de substituições de aminoácidos em qualquer dada posição que resultou em ligação otimizada, na mesma ligação, pior ligação ou nenhuma ligação, conforme mostrado no Quadro 5. Esta informação permitiu 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 as quais podem ser alteradas para uns poucos aminoácidos ou muito poucos aminoácidos (em algumas formas de realização, nenhum aminoácido). Estes resultados também demonstraram substituições de aminoácidos que aumentaram a afinidade de ligação.

(b) Maturação de afinidade

Em seguida, os resultados da análise por randomização de bibliotecas pequenas (acima) foram usados para selecionar resíduos para produção das bibliotecas H3 e L3 para maturação de afinidade das CDRs H3 e L3. Os resíduos Y101 e G103 de CDR H3 e os resíduos S91 e K92 de CDR L3 foram selecionados para produção das bibliotecas H3 e L3 para maturação de afinidade das CDRs H3 e L3.

Esta biblioteca combinou mutações em H3 e L3 ao mesmo tempo no clone 8L2-6D5 enxertado em CDR, e separadamente no fundo de H19-L129, e teve uma diversidade de 80 clones diferentes. O Quadro 7 mostra os resíduos aminoácidos selecionados para substituição e os aminoácidos que foram substituídos em cada posição.

Quadro 7. Resíduos aminoácido em 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-se 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 expresso como um Fab, e a afinidade para NGF humano de 96 clones individuais foi rastreada para cada biblioteca usando análise BIACORE de acordo com as instruções do fabricante e descrita acima. Os resultados desta análise são mostrados no Quadro 8.

Quadro 8.

| MUTAÇÕES DE COMBINAÇÃO CDR L3 H3 | K_{off} (s-1) | K_D^* (nM) |
|--|----------------------------|--------------|
| (modelo 8L2-6D5) | 1E-3 | 25 |
| L_S91E; L_K92A (CDR sequência QQEATLPYT (SEQ ID NO: 51)) H_Y101W; HJ3103A (CDR sequência GGYWYATSYFFDY (SEQ ID NO: 52)) | 5,5E-4 | 13 |
| L_S91 E; L_K92R (CDR sequência QQERTLPYT (SEQ ID NO: 53)) H_Y101W; H_G103A (CDR sequência GGYWYATSYFFDY (SEQ ID NO: 54)) | 1,0E-4 | 25 |
| MUTAÇÕES DE COMBINAÇÃO CDR L3 H3 (modelo H19-L129, H1H2L1L2 maturado) | k_{off} (s-1) 1,1 e-4 | K_D^* (nM) |
| L_S91 E; L_K92H (CDR sequência QQEHTLPYT (SEQ ID NO: 55)) H_Y101W; H_G103A (CDR sequência GGYWYATSYFFDY (SEQ ID NO: 56)) (CLONE E3) | 1,2E-5 | 0,3 |
| L_S91 E; L_K92S (CDR sequência QQESTLPYT (SEQ ID NO: 57)) H_Y101W; H_G103S (CDR sequência GGYWYSTSYFFDY (SEQ ID NO: 58)) | 4,7E-5 | 1,1 |
| L_S91 E; L_K92K (CDR sequência QQEKTLPYT (SEQ ID NO: 59)) H_Y101Y; H_G103A (CDR sequência GGYYYATSYFFDY (SEQ ID NO: 60)) | 2E-5 | 0,5 |

| MUTAÇÕES DE COMBINAÇÃO CDR L3 H3 | K_{off} (s ⁻¹) | K_D^* (nM) |
|---|------------------------------|--------------|
| (modelo 8L2-6D5) | 1E-3 | 25 |
| L_S91 E; L_K92R (CDR sequência QQERTLPYT (SEQ ID NO: 61)) H_Y101W; H_G103A (CDR sequência GGYWYATSYFDY (SEQ ID NO: 62)) (CLONE 3C) | 1,4E-5 | 0,35 |
| L_S91 E; L_K92R (CDR sequência QQERTLPYT (SEQ ID NO: 63)) H_Y101Y; H_G103A (CDR sequência GGYYYATSYFDY (SEQ ID NO: 64)) | 1,5E-5 | 0,37 |
| *KD calculada usando k_{on} 4e4 M ⁻¹ s ⁻¹ | | |

Com base na afinidade de ligação, os melhores clones, E3 (de modo intercambiável denominado "3E") e 3C, foram selecionados para caracterização adicional. E3 compreendeu as seguintes substituições de CDR: CDR-H3: Y101W, G103A; e CDR-L3: S91E, K92H, as quais foram combinadas num único clone o qual também incluiu 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 de cadeia leve de E3 é mostrada nas Figuras 1A e 1B. 3C compreendeu as seguintes substituições de CDR: CDR-L3: S91E; K92R; CDRH3: Y101W; G103A, as quais foram combinadas num único clone o qual também incluiu as seguintes mutações L1, L2, H1 e H2 descritas para o clone 3E.

As sequências 3E e 3C foram clonadas em vetores de expressão de mamífero para produção de Fab e anticorpo total, e expressas em células HEK293 e purificadas usando Ni-NTA ou cromatografia de proteína A. Proteína pura foi precisamente quantificada por análise de aminoácidos.

As afinidades de ligação a NGF humano dos Fabs E3 e 3C foram medidas usando análise BIAcore de acordo com as instruções do fabricante e conforme descrito acima, exceto

que 100 RU NGF foi usado sobre o chip para prevenir um efeito de religação. Em resumo, várias concentrações de anticorpos (Fabs) foram injetados por 2 minutos sobre um chip CM5 com 100 RU de NGF humano imobilizado sobre o mesmo, e permitiu dissociar por 1800 segundos. Anticorpo de ratinho 911 (Fab) foi analisado como um controlo. Os dados foram analisados usando o *software* BIAevaluation seguindo as instruções do fabricante. Os resultados da análise do anticorpo E3 e 911 são mostrados nas Figuras 9 e 10. E3 ligou-se a NGF humano com uma KD de cerca de 0,07 nM (e com uma k_{on} de cerca de $6,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, e um K_{off} de cerca de $4,2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). 3C ligou-se a NGF humano com uma KD de cerca de 0,35 nM (com um K_{off} de cerca de $1,4 \times 10^{-5}$). Em contraste, anticorpo de ratinho 911 ligou NGF com uma KD de 3,7 nM, K_{off} de $8,4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ e k_{on} de $2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

O anticorpo E3 (denominado de modo intercambiável 3E) foi selecionado por análise adicional com base na afinidade de alta ligação. Para testar a capacidade de E3 para prevenir a interação de NGF com os recetores de NGF trkA e p75, 2,5 nM de NGF humano foi pré-misturado e incubado por uma hora com 0 a 50 nM do anticorpo E3 (Fab). Depois da incubação, foram injetadas amostras a 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ sobre um chip BIAcore CM5 contendo 260 RU de p75 (canal 2) e 600 RU de trkA (canal 3), e foi determinada a percentagem de ligação. Os resultados desta análise são mostrados na Figura 11. Concentrações aumentadas de Fab E3 bloquearam a interação de NGF tanto com p75 quanto com trkA, conforme mostrado por sinal reduzido (medido em RU), indicando que Fab E3 bloqueia a interação de NGF humano com tanto trkA quanto p75. Quando a concentração de anticorpo E3 (Fab) foi igual à concentração de NGF (a cerca de 2,5 nM de concentração de NGF), não foi observada nenhuma ligação de NGF (conforme mostrado por um sinal de zero). O facto de ter ocorrido zero por cento de ligação NGF- recetor quando a concentração de NGF foi igual à concentração de anticorpo

3E sugeriu que 2,5 nM de NGF era pelo menos dez vezes maior do que a kD de E3 para NGF e em equilíbrio.

Exemplo 2: Avaliação da capacidade de bloqueio de NGF de anticorpos anti- NGF usando ensaio de sobrevida neurónio trigeminal E13.5 de ratinho

A capacidade de Fab E3 ou anticorpo total E3 para bloquear a atividade de NGF foi avaliada por medição da capacidade do anticorpo para inibir a sobrevida dependente de NGF de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho *in vitro*. O gânglio trigeminal consiste em neurónios sensoriais cutâneos que enervam a região facial. A sobrevida de neurónios trigeminais E13.5 de ratinho é um ensaio sensível para avaliar a atividade de bloqueio de NGF de anticorpos antagonistas anti-NGF porque é necessário NGF para suportar a sobrevida destes neurónios. Por exemplo, em concentrações saturantes de NGF, a sobrevida é próxima de 100% por 48 horas em cultura. Em contraste, menos de 5% dos neurónios sobrevivem por 48 horas na ausência de NGF.

O ensaio de sobrevida foi conduzido como se segue: ratinhos fêmeas Swiss Webster prenhas combinadas por tempo foram eutanizadas por inalação de CO₂. As trompas uterinas foram removidas e os embriões no estágio embrionário E13.5 foram extraídos e decapitados. Os gânglios trigeminais foram dissecados usando agulhas de tungsténio estimuladas electroliticamente. Os gânglios foram em seguida tripsinizados, dissociados mecanicamente e laminados numa densidade de 200 a 300 células por poço em meio Ivire de 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 avaliada 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 representou uma concentração saturante de NGF para

sobrevida) e 0,04 ng/ml (~1,5 pM; esta concentração é em torno de CI50). Depois de 48 horas em cultura, as células foram submetidas a um protocolo de imunocitoquímica automatizado realizado numa estação de trabalho de manipulação de líquido Biomek FX (Beckman Coulter) como se segue: fixação usando 4% de formaldeído, 5% de sacarose, e PBS; permeabilização usando 0,3% de Triton X-100 em PBS); bloqueio de locais de ligação não específica usando 5% de soro de cabra normal, 0,11% de BSA em PBS; e incubação sequencial com alguns anticorpos primários e secundários para detetar neurónios. O anticorpo primário foi anticorpo policlonal de coelho contra o produto genético proteico 89,5 (PGP9.5, Chemicon), um marcador fenotípico neuronal estabelecido. O anticorpo secundário foi anti coelho de cabra Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), junto com o corante nuclear Hoechst 33342 (Molecular Probes) para marcar os núcleos de todas as células presentes na cultura. A aquisição de imagem e a análise de imagem foram realizadas num Discovery-1/Gen11 Imager (Universal Imaging Corporation). As imagens foram automaticamente adquiridas em dois comprimentos de onda por Alexa Fluor 488 e Hoechst 33342, com a coloração nuclear sendo usada como ponto de referência para o sistema de autofoco baseado nas imagens do Imager, uma vez que a coloração nuclear está presente em todos os poços. Objetivos apropriados e número de locais estudados por imagens por poço foram selecionados para cobrir toda a superfície de cada poço. Análise de imagens automatizada foi estabelecida para contar o número de neurónios presentes em cada poço depois de 48 horas em cultura com base em sua coloração específica com o anticorpo anti-PGP9.5. Cuidadoso limiar da imagem e aplicação de morfologia e filtro de seletividade à base da intensidade de fluorescência resultou numa contagem precisa de neurónios por poço.

Os resultados desta experiência demonstraram que Fab

E3 bloqueou a atividade de NGF com uma alta afinidade. Os resultados são mostrados nas Figuras 4 a 6, e no Quadro 9.

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

A Figura 5 é um gráfico comparando o efeito de bloqueio de NGF de vários Fabs na presença ou de 0,04 ng/ml de NGF humano (cerca de 1,5 pM; mostrado no painel inferior) ou de 0,4 ng/ml de NGF humano (cerca de 15 pM; mostrado no painel superior). 1,5 pM de NGF foi em torno da EC50 do NGF estimulando sobrevida, ao passo que 15 pM representou uma concentração saturante de NGF. A sobrevida de neurónios trigeminiais de ratinho E13.5 em várias concentrações de Fab E3; Fab 911 murino; e Fab H19-L129 e Fab 8L2-6D5 foram avaliados conforme descrito acima. A CI50 (em pM) foi calculada para cada Fab em cada concentração de NGF, e é mostrada no Quadro 9. Fab E3 bloqueou fortemente a sobrevida de neurónios trigeminiais dependente de NGF humano, com uma CI50 de cerca de 21 pM na presença de 15 pM de NGF humano, e uma CI50 de cerca de 1,2 pM na presença de 1,5 pM de NGF humano. Fabs 3C e H19-L129 também bloquearam fortemente a sobrevida de neurónios trigeminiais dependente de NGF humano.

A Figura 6 é um gráfico comparando o efeito de bloqueio de NGF de vários Fabs na presença de ou 0,04 ng/ml de NGF de rato (cerca de 1,5 pM; mostrado no painel inferior) de ou 0,4 ng/ml de NGF de rato (cerca de 15 pM; mostrado no painel superior). 1,5 pM de NGF foi em torno da EC50, ao passo que 15 pM representou uma concentração saturante de NGF. A sobrevida de neurónios trigeminiais de ratinho E13.5 em várias concentrações de Fab E3; Fab 911 murino; e Fab H19-L129 e 8L2-6D5 foram avaliados conforme descrito acima. A EC50 (em pM) foi calculada para cada Fab em cada concentração de NGF, e é mostrada no Quadro 9. Fab E3 bloqueou fortemente a sobrevida de neurónios trigeminiais

dependente de NGF humano, com uma CI50 de cerca de 31,6 pM na presença de 15 pM de NGF de rato, e uma CI50 de cerca de 1,3 pM na presença de 1,5 pM de NGF de rato. Fabs 3C e H19-L129 também bloquearam fortemente a sobrevivência de neurónios trigeminais dependente de NGF de rato.

Quadro 9:

| NGF Humano | CI50 (na presença de 15 pM de NGF) | CI50 (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 | CI50 (15 pM de NGF) | CI50 (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 |

Em uma experiência diferente, comparou-se a capacidade do anticorpo total E3 e Fab 3E para inibir a sobrevivência dependente de NGF de neurónios E13.5 na presença de 0,4 ng/ml (concentração saturante) de NGF humano. Os resultados da análise são mostrados na Figura 12. O anticorpo total E3

e Fab 3E apresentou níveis semelhantes de inibição da sobrevivência dependente de NGF quando a concentração de anticorpo total e Fab foram normalizadas para o número de locais de ligação de NGF (Fab tem um local de ligação e anticorpo total tem dois locais de ligação). Estes resultados demonstraram que não houve efeito de avididade devido à ligação de um anticorpo total ao dímero de NGF.

Em outras experiências, comparou-se a capacidade de várias concentrações (20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 0,0064, 0,00128, e 0,0 nM) do anticorpo E3, anticorpo 911, e uma imunoadesina de recetor trkA (consistindo no domínio extracelular do recetor de NGF trkA fusionado com o domínio de imunoglobulina Fc, CH2-CH3) para inibir a sobrevivência dependente de NGF de neurónios E13.5 na presença de 0,4 ng/ml (condições saturantes). Estes resultados são mostrados na Figura 13. Estes resultados demonstraram que o anticorpo E3 bloqueou NGF melhor do que ou o anticorpo 911 ou a trkA imunoadesina.

Exemplo 3: Avaliação da especificidade do anticorpo anti-NGF E3 usando ensaios de sobrevivência de neurónios trigeminais e nodoso de rato

A capacidade do anticorpo E3 para bloquear especificamente a atividade de NGF foi avaliada por medição da capacidade do anticorpo para inibir a sobrevivência de neurónios trigeminais E17/18 de rato *in vitro* na presença de concentrações saturantes de NGF, a neurotrofina NT3 relacionada com NGF, ou o fator neurotrófico não relacionado com NGF, proteína estimulante de macrófago (MSP). A sobrevivência de neurónios trigeminais E17/18 de rato é um ensaio sensível para avaliar a atividade de bloqueio de NGF de anticorpos antagonistas anti-NGF porque é necessário NGF para suportar a sobrevivência destes neurónios em concentrações maiores do que o nível de NGF requerido para suportar a sobrevivência de neurónios E13.5 TG. A sobrevivência destes neurónios também é suportada por NT3 ou

MSP; portanto, a sobrevivência destes neurónios também é um ensaio sensível 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 por medição da capacidade do anticorpo para inibir a sobrevivência de neurónios E17 nodosos de ratinho na presença de concentrações saturantes de BDNF ou NT4/5. A sobrevivência de neurónios nodosos é suportada por BDNF ou NT4/5; portanto, a sobrevivência destes neurónios é um ensaio sensível para avaliar a atividade de bloqueio de BDNF ou NT4/5 do anticorpo antagonista anti-NGF.

O ensaio de sobrevivência foi conduzido como se segue: ratinhos fêmeas Swiss Webster prenhas combinados por tempo foram eutanizados por inalação de CO₂. As trompas uterinas foram removidas e os embriões (no dia embrionário 17 ou 18) foram extraídos e decapitados. Os gânglios trigeminais e nodosos foram dissecados e limpados. Em seguida os gânglios foram tripsinizados, dissociados mecanicamente e laminados numa densidade de 100 a 300 células por poço em meio livre de soro definido em placas de 4 poços (Greiner) revestidas com poli-L-ornitina e laminina.

Neurónios trigeminais E17/18 foram cultivados ou sem fatores neurotróficos adicionados (controlo negativo) ou na presença de concentrações saturantes de NGF humano (400 pM e 15 pM) (controlo positivo); NT3 (400 pM); ou MSP (600 pM). Foram estabelecidas culturas em duplicata que incluíram concentrações variáveis de Fabs E3 e 911 e anticorpos totais. A concentração de Fab e anticorpos totais foi indicada por local de ligação (por exemplo, um anticorpo total contém dois locais de ligação, ao passo que um Fab contém um local de ligação).

Neurónios nodosos E17 foram cultivados ou na ausência de fatores neurotróficos adicionados (controlo negativo), ou com concentrações saturantes de BDNF (400 pM) (controlo

positivo) ou NT4/5 (400 pM) ou fator de crescimento não relacionado com NGF ILF (fator inibitório de interleucina). Altas concentrações de neurotrofinas foram usadas, uma vez que a meta desta experiência foi testar a especificidade dos anticorpos. Foram estabelecidas culturas em duplicata que incluíram variar novamente com e sem a adição de anticorpos E3 e 911. Depois de 48 horas em cultura o número total de neurónios sobreviventes em cada poço sob cada condição foi determinado por contagem manual usando um microscópio de contraste de fase.

Os resultados destas experiências demonstraram que anticorpos E3 e 911 bloquearam completamente os efeitos estimuladores de sobrevivência de NGF sobre neurónios trigeminiais E18. Em contraste, anticorpos E3 e 911 não tiveram efeito sobre a sobrevivência de neurónios trigeminiais estimulados por NT3 ou MSP, ou a sobrevivência de neurónios nodosos estimulada por BDNF ou NT4/5 ou LIF. Estes resultados demonstraram que o anticorpo E3 possuiu especificidade seletiva para NGF, uma vez que não foi detetada interação entre estes anticorpos e outras neurotrofinas relacionadas com NGF (NT3, NT4/5, BDNF) em concentrações 1000 vezes a 10.000 vezes maiores do que concentração eficaz para bloqueio de NGF. Além disso, estes resultados demonstraram que a morte neuronal vista em neurónios dependentes de culturas de NGF suplementadas com NGF na adição do anticorpo ou Fab E3 foi devido a uma interação específica entre estes anticorpos e NGF e não foi devido a um efeito tóxico generalizado. Anticorpo antagonista anti-NGF de ratinho 911 também foi testado, e foram observados resultados semelhantes. Observar que devido às altas concentrações de neurotrofinas usadas, ambos os anticorpos E3 e 911 estão muito próximos a suas condições de titulação e se esperou que ligassem NGF em níveis semelhantes porque as diferenças na afinidade de ligação destes anticorpos a NGF seria menos evidente sob

estas condições.

Os resultados destas experiências são mostrados nas figuras 14, 15, 16, e 17. Os dados mostraram a percentagem da sobrevida média depois de 48 horas em cultura (+ erro padrão da média, $n = 3$ para cada ponto dos dados) relativa à sobrevida vista no controlo positivo para cada experiência (por exemplo, 100% de sobrevida de neurónios trigeminados cultivados na presença de concentração de NGF saturante, e 100% de sobrevida de neurónios nodosos cultivados na presença de concentração de BDNF saturante, respetivamente). As Figuras 14-15 são gráficos que mostra que anticorpo antagonista anti-NGF E3 ou Fab E3 não inibiram a sobrevida promovida por NT3, e MSP, mesmo em concentrações de anticorpo tão elevadas quanto 200 nM. Em contraste, 20 nM do anticorpo E3 ou Fab 3E e Fab 911 bloquearam totalmente a sobrevida provocada por NGF. Anticorpo antagonista anti-NGF de ratinho 911 também foi testado, e foram observados resultados semelhantes. Especificamente, a Figura 14 é um gráfico que mostra comparação do efeito de várias concentrações (20 nM, 2 nM, ou 0,2 nM) de Fab E3 (denominado "3E" na figura) e anticorpo Fab 911 de ratinho sobre a sobrevida de neurónios trigeminais E18 na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "controlo"), 400 pM de NGF (denominado "NGF-400 pM), 10 nM de NT3 (denominado "NT3-10 nM) ou 600 pM de MSP (denominado "MSP-600 pM). A Figura 15 é um gráfico representando comparação do efeito de várias concentrações (200 nM e 80 nM) de E3 Fab e anticorpo total e anticorpo de ratinho 911 anticorpo total e Fab da sobrevida de neurónios trigeminais E17 na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "nenhum fator"), 400 pM de NGF (denominado "NGF-400 pM), 10 nM de NT3 (denominado "NT3-10 nM) ou 600 pM de MSP (denominado "MSP-600 pM).

A Figura 16-17 são gráficos que mostra que anticorpo

antagonista anti-NGF E3 ou Fab E3 não inibiram a sobrevivência de neurónios nodosos E17 promovida por BDNF, NT4/5 ou LIF. Anticorpo antagonista anti-NGF 911 de ratinho também foi testado, e foram observados resultados semelhantes. Especificamente, a Figura 16 é um gráfico que mostra comparação do efeito de várias concentrações (200 nM ou 80 nM) de anticorpo total E3 (denominado "3E na figura"), Fab E3, anticorpo total 911, ou Fab 911 sobre a sobrevivência de neurónios nodosos E17 na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "nenhum fator"), 400 pM de BDNF (denominado "BDNF-400pM), 400 pM de NT4/5 (denominado "NT4/5-400 pM), ou 2,5 nM de LIF (denominado "LIP-2,5 nM). A Figura 17 é um gráfico que mostra comparação do efeito de várias concentrações (200 nM, 20 nM, 2nM) de Fab E3 (denominado "3E na figura"), ou Fab 911 sobre a sobrevivência de neurónios nodosos E17 na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "controlo"), 400 pM de BDNF (denominado "BDNF-400 pM), 400 pM de NT4/5 (denominado "NT4/5-400 pM), or 2,5 nM de LIF (denominado "LIP-2,5 nM).

Exemplo 4: Preparação de vetores de expressão de mamífero e expressão do anticorpo E3 em células de mamíferos

Três vetores de expressão de mamíferos foram projetados e construídos para utilização na expressão do anticorpo E3 em 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 expressão transitória ou estável da cadeia pesada. Db.911.3E consiste em sequências de nucleótidos correspondentes às seguintes regiões: a região promotora de citomegalovírus murino (nucleótidos 1-612); um intrão sintético (nucleótidos 619-1507); a região codificante DHFR (nucleótidos 707-1267); péptido de sinalização de hormona de crescimento humano (nucleótidos 1525-1602); região variável de cadeia pesada de anticorpo 3E (nucleótidos

1603-1965); região constante de IgG2a de cadeia pesada humana contendo as seguintes mutações: A330P331 a S330S331 (numeração de aminoácidos com referência à sequência IgG2a selvagem; veja-se Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624); sinal de poliadenilação tardio SV40 (nucleótidos 2974-3217); região intensificadora de SV40 (nucleótidos 3218-3463); região de fago f1 (nucleótidos 3551-4006) e região codificante de beta lactamase (AmpR) (nucleótidos 4443-5300). Db.911.3E foi depositado na ATCC em 8 de Janeiro de 2003, e foi atribuído o N° de Acesso ATCC 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 capa humana, e é adequado para expressão transitória da cadeia leve. Eb.911.3E consiste em sequências de nucleótidos correspondentes às seguintes regiões: a região promotora de citomegalovírus murino (nucleótidos 1-612); intrão EF-1 humano (nucleótidos 619-1142); péptido de sinalização de hormona de crescimento humano (nucleótidos 1173-1150); região variável de cadeia leve do anticorpo E3 (nucleótidos 1251-1571); região constante de cadeia capa humana (nucleótidos 1572-1892); sinal de poliadenilação tardio SV40 (nucleótidos 1910-2153); região intensificadora de SV40 (nucleótidos 2154-2399); região de fago f1 (nucleótidos 2487-2942) e região codificante de beta lactamase (AmpR) (nucleótidos 3379-4236). Eb.911.3E foi depositado na ATCC em 8 de Janeiro de 2003, e foi atribuído o N° de Acesso ATCC 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 capa humana, e é adequado para expressão estável da cadeia leve. Eb.pur.911.3E consiste em sequências de nucleótidos correspondentes às seguintes regiões: região promotora de citomegalovírus murino (nucleótidos 1-612); intrão EF-1 humano (nucleótidos 619-1758); região codificante do gene pac (puromycinR)

(nucleótidos 739-1235); região hsp70 5'UTR humana (nucleótidos 1771-1973); péptido de sinalização de hormona de crescimento humano (nucleótidos 1985-2062); região variável de cadeia leve do anticorpo E3 (nucleótidos 2063-2383); região constante de cadeia capa humana (nucleótidos 2384-2704); sinal de poliadenilação tardio SV40 (nucleótidos 2722-2965); região intensificadora de SV40 (nucleótidos 2966-3211); região de fago f1 (nucleótidos 3299-3654) e região codificante de beta lactamase (AmpR) (nucleótidos 4191-5048). Eb.pur.911.E3 foi depositado na ATCC em 8 de Janeiro de 2003, e foi atribuído o N° de Acesso ATCC PTA-4894.

Expressão celular transitória foi realizada como se segue: células CHO e HEK293T em placas de 150 mm foram co-transfectadas transitoriamente com 25 ug de cada plasmídeo (isto é, um plasmídeo contendo a cadeia pesada e um plasmídeo contendo a cadeia leve). O ADN foi misturado com 100 ul de lipofetamina 2000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os complexos de ADN-lípídeo foram deixados para entrar em contacto com as células em meio DMEM/F12 sem soro ou antibióticos por 5 horas. Depois desta incubação, o meio foi trocada para expressão para Opti-MEM (Invitrogen) sem quaisquer aditivos por dois dias. Sobrenadantes celulares contendo anticorpo foram colhidos sequencialmente até quatro vezes com reposição de meio subsequente. Os sobrenadantes foram purificados por cromatografia por afinidade usando resina MapSelect Protein A (Amersham biosciences 17-5199-02). O anticorpo foi ligado à resina de proteína A em 0,3 M de glicina, 0,6 M de tampão NaCl em pH 8, em seguida eluído com 0,1 M de tampão de citrato em pH 3. Frações contendo anticorpo foram imediatamente neutralizadas com 1 M de tampão de Tris em pH 8,0, Frações de anticorpos foram em seguida dialisadas e concentradas em PBS.

Exemplo 5: Anticorpo anti-NGF E3 é eficaz no tratamento de

dor pós-cirúrgica

Foi usado um modelo de dor que simula a dor pós cirúrgica para avaliar a eficácia do tratamento com anticorpo E3. Anticorpo E3 compreendeu a região constante de IgG2a de cadeia pesada humana contendo as seguintes mutações: A330P331 a S330S331 (numeração de aminoácidos com referência à sequência IgG2a selvagem; veja-se Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624); a região constante capa de cadeia leve humana; e as regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve mostradas nos Quadros 1A e 1B.

Animais. Ratos machos Sprague Dawley pesando entre 220 e 240 gramas foram adquiridos da Harlan (Wisconsin) e aclimatados às instalações animais por 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 um isoflurano a 2% em mistura de ar que foi mantida durante a cirurgia através de um cone nasal. A superfície plantar da pata traseira direita foi preparada com um chumaço de iodo povidona, e foi feita uma incisão longitudinal central de 1 cm através da pele e fáscia, iniciando a 0,5 cm da borda do calcânhar e se estendendo em direção dos dedos dos pés. Foram feitas medições com uma régua com a pata mantida numa posição flexionada. O músculo plantar foi elevado usando fórceps curvado e incisado longitudinalmente. O músculo foi incisado através de toda a sua profundidade, entre a origem e a inserção. O sangramento foi controlado durante toda a cirurgia por pressão aplicada através de um chumaço de gaze. O ferimento foi fechado com duas suturas de colchão (monofilamento de etilon black 5-0). Estas suturas foram amarradas 5 a 6 vezes, com o primeiro nó amarrado frouxamente. O local do ferimento foi esfregado com mecha com solução de bacitracina. Aos animais foi permitido se recuperarem e repousar dentro de gaiolas limpas por duas

horas ou mais antes da experimentação comportamental se iniciar.

Avaliação de dor em repouso. Foi usado uma pontuação de dor cumulativa para avaliar dor relacionada com o ato de carregar peso. Os animais foram colocados sobre uma malha plástica (grade: de 8 mm²) dentro de gaiolas claras de plástico que foram elevadas sobre uma plataforma (h: 18") permitindo a inspeção do lado inferior de suas patas. Depois de um período de aclimatação de 20 minutos, o ato de carregar peso foi avaliado numa escala de 0 a 2. Uma pontuação de 0 foi dada se a pata estivesse descorada ou pressionada contra a malha, indicando ato de carregar peso máximo. Uma pontuação de 1 foi dada se a pata estivesse favorecida com a pele somente tocando a malha, sem descoramento ou indentação da pele. Uma pontuação de 2 foi dada se a pata estivesse mantida completamente fora da malha. Retração da pata foi considerada um 2 se o rato ainda estivesse em repouso. Cada animal foi observado por 1 minuto a cada 5 minutos por 30 minutos. A soma de 6 pontuações (0 a 12) obtidos durante 1/2 hora foi usada para avaliar a dor na pata incisada. A frequência de pontuações de 2 também foi calculada e foi usada para avaliar a incidência de dor severa ou total proteção da pata pelo animal. Cada animal foi testado 24 horas antes da cirurgia (avaliação inicial), e 2 horas, 24 horas, 48 horas, e 72 horas depois da cirurgia. Os resultados desta experiência são mostrados na Figura 1, a qual representa a pontuação da dor cumulativa em repouso observada em animais tratados com 35 mg/kg de anticorpo anti-NGF 911 de ratinho. Estes resultados demonstraram que o tratamento com anticorpo anti-NGF reduziu significativamente a dor em repouso pós-cirúrgica. O ato de carregar peso foi um bom correlato de o quão disposto o animal estava a usar o membro, e portanto foi uma medida eficaz do alívio da dor.

O anticorpo E3 foi injetado por 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 animal) em 15 horas pré-incisão. O grupo de controlo negativo não recebeu nenhum anticorpo mas foi injetado i.p. com uma solução salina. Fentanilo a 0,01 mg/kg foi injetado i.p. como um controlo positivo 30 minutos antes da experimentação em 24 horas pós-cirurgia. Cada experiência envolveu 8 animais ($n = 8$ por grupo) para cada condição, e o grupo de controlo teve 56 animais. A cirurgia foi realizada e uma pontuação da dor cumulativa foi medido conforme descrito acima. A dor em repouso foi avaliada vinte e quatro horas depois da cirurgia.

Conforme mostrado na Figura 7, anticorpo anti-NGF humanizado E3 reduziu significativamente a dor em repouso ($p < 0,05$) depois de cirurgia quando administrado a 0,02 mg/kg a 1 mg/kg de dosagem. Um "*" denota uma diferença significativamente importante do controlo ($p < 0,05$). Tratamento com 0,02 mg/kg aliviou o comportamento da dor de modo pelo menos tão eficaz quanto tratamento com 0,01 mg/kg de fentanilo. Esta dose de fentanilo é 10 vezes a dose humana normal deste potente opioide.

Em outra experiência, testou-se a eficácia do anticorpo E3 para reduzir a dor pós-cirúrgica quando administrado pós-cirurgicamente. Anticorpo E3 (0,5 mg/kg) foi injetado por via intravenosa (i.v.) duas horas depois da cirurgia. O grupo de controlo não recebeu anticorpo mas foi injetado i.v. com uma solução salina. Foi realizada cirurgia e a dor em repouso expressa como uma pontuação da dor cumulativa foi avaliada 24 horas depois da cirurgia. Conforme mostrado na Figura 8, tratamento com anticorpo anti-NGF reduziu significativamente ($p < 0,05$) a dor em repouso em vinte e quatro horas depois de incisão quando o anticorpo foi administrado 2 horas pós- incisão. Estes resultados demonstraram que o anticorpo E3 aliviou de modo eficaz a dor pós-cirúrgica quando administrado depois da

cirurgia.

Exemplo 6: Avaliação dos efeitos analgésicos do anticorpo antagonista anti- NGF 911 num modelo de rato de artrite reumatoide

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

Cinquenta (50) ratos machos Lewis (LEWIS LEW / Cri Ico) (Charles River Bélgica) pesando 150 g a 220 g no início da fase experimental foram incluídos neste estudo. Todos os animais foram mantidos por pelo menos 5 dias antes da experiência, e foram alojados num ambiente de temperatura (19,5 a 24,5 °C), humidade relativa (45 a 65%) e ciclo de 12 horas de luz / escuridão controlados com acesso ad libitum a água corrente filtrada e ração de laboratório em grânulos padrão (U.A.R., França) do início ao fim do estudo. Os animais foram identificados individualmente sobre a cauda.

No dia 0 (D0), foi induzida artrite em ratos por injeção intradérmica na cauda de 0,05 ml de uma suspensão de *Mycobacterium butyricum* (Difco, USA) em óleo mineral (10 mg/ml). No dia 14 (D14), ratos artríticos foram incluídos no estudo de acordo com sua capacidade de vocalizar na suave flexão da pata traseira e por seu índice de artrite, avaliado usando uma pontuação de inflamação para cada pata traseira e cada pata dianteira (veja-se Kuzuna *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (Tóquio) 23:1184-1191 (1975); Pearson *et al.*, *Arthritis Rheum.* 2:440-459 (1959)). Os animais foram classificados com base nos seguintes critérios: Pontuação 0: aspeto normal; Pontuação 1: eritema; Pontuação 2: eritema com ligeiro edema; Pontuação 3: forte inflamação sem anquilose; Pontuação 4: anquilose. Somente animais com

capacidade de vocalizar na suave flexão e apresentando uma pontuação de 2 ou 3 foram incluídos no estudo.

Quatro grupos de 10 ratos cada foram incluídos no estudo. Para o grupo 1 (veículo), no dia 14 (D14), depois da seleção, aos ratos foi administrado por via intravenosa veículo (solução salina). No dia 18 (D18), a intensidade nociceptiva foi avaliada por suave flexão da pata traseira e a intensidade do nível de experimentação foi registada para cada animal. Para o grupo 2 (4 dias), no D14, depois da seleção, aos ratos foi administrado por via intravenosa 911 (10 mg/kg). No dia 18 (D18), a intensidade nociceptiva foi avaliada por suave flexão da pata traseira e a intensidade do nível de experimentação foi registada para cada animal. Para o grupo 3 (24 horas), no dia 17 depois de injeção de CFA, aos ratos foi administrado por via intravenosa 911 (10 mg/kg). A intensidade nociceptiva foi avaliada por suave flexão da pata traseira 24 horas depois, e a intensidade do nível de experimentação foi registada para cada animal. Para o grupo 4 (indometacina), no dia 18 (D18), a intensidade nociceptiva foi avaliada por suave flexão da pata traseira uma hora depois de administração oral de indometacina (10 mg/kg). A intensidade do nível de experimentação também foi registada para cada animal. As substâncias de ensaio foram administradas de uma maneira cega e aleatória por via intravenosa sob um volume de 5 ml/kg, ao passo que a indometacina foi administrada por via oral sob um volume de 10 ml/kg.

Os efeitos analgésicos do anticorpo anti-NGF 911 são mostrados no Quadro 10. Os resultados foram expressos para cada grupo à medida que a intensidade nociceptiva avaliou a intensidade do nível de vocalização registado para cada animal em mV (média \pm epm), e a percentagem de variação da intensidade nociceptiva calculada a partir do valor médio do grupo tratado com veículo. A importância estatística entre os grupos tratados e o grupo de veículo foi

determinada com um ensaio de Dunnett usando a variância residual depois de uma análise unidirecional da variância ($P < 0,05$).

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

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

Os resultados são expressos como média ± epm

n = 10 ratos por grupo

Dia 0 (D0): Indução de Artrite crónica por administração de CFA

Veículo: solução salina

911 (10 mg/kg) foi administrado por via intravenosa em D14 ou D17 e a medição da dor foi realizada em D18. Indometacina (10 mg/kg) foi administrada por via oral em D18 e a medição da dor foi realizada uma hora depois da dosagem. Teste de Dunnett:* indica uma diferença significativa em comparação com o grupo tratado com veículo para $P < 0,05$

Conforme mostrado no Quadro 10, o anticorpo anti-NGF 911 reduziu significativamente a dor num modelo de artrite reumatoide em rato 24 horas ou 4 dias depois de uma única administração do anticorpo.

Exemplo 7: Efeitos farmacológicos do anticorpo antagonista anti-NGF E3 e 911 num modelo de artrite reumatoide em rato

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 indometacina usada como uma substância interna de controlo positivo. Os efeitos analgésicos de E3 e 911 foram avaliados pela medição da reação nociceptiva. Os efeitos anti-inflamatórios foram avaliados pelo volume da pata, índice de artrite (pontuação de inflamação), peso corporal e das patas traseiras. Os níveis de citocinas das patas (IL-6, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1), TGF- β 1 circulante no soro, concentrações plasmáticas de E3 e 911, parâmetros biológicos e radiografias de raios-X foram realizados ao final da experiência.

Protocolo experimental

1. Projeto do estudo

80 ratos machos Lewis (LEWIS Lew / Ico) (Charles River Laboratories - Bélgica) de 5 semanas de idade foram incluídos neste estudo. Eles foram alojados num ambiente de temperatura (19,5-24,5 °C) e humidade relativa (45-65%) controladas com um ciclo de 12 horas de luz / escuridão, com acesso *ad libitum* a água corrente filtrada e ração de laboratório em grânulos padrão (SAFE, França) do início ao fim do estudo. No recebimento nas instalações animais, eles foram alojados 5 por gaiola e foram observados por um período de aclimação de 10 dias antes de qualquer experiência. Os animais foram identificados individualmente na cauda.

Cinco grupos de 10 animais (ratos machos Lewis de 5 semanas de idade - LEWIS Lew/Ico, dos Charles River Laboratories - Bélgica) foram incluídos cada um neste estudo: Grupo 1: ratos não artríticos / solução salina (veículo), bolus i.v., n = 10; Grupo 2: ratos artríticos / solução salina (veículo), bolus i.v., n = 10; Grupo 3: ratos artríticos / Indometacina 3 mg/kg, por via oral diariamente durante 10 dias, n = 10; Grupo 4: ratos artríticos / E3, 1 mg/kg, bolus i.v, n = 10; Grupo 5: ratos

artríticos / 911,10 mg/kg, bolus i.v, n = 10. As doses foram expressas em termos de substância ativa livre (mg/kg). E3 e 911 foram preparados extemporaneamente em solução salina a partir da solução de matéria-prima para a concentração desejada. E3 1 mg/kg: 3,41 ml da solução de matéria-prima (0,88 mg/ml) q.s.p. 15 ml de solução salina. 911 10 mg/kg: 12 ml da solução de matéria-prima (2,5 mg/ml) q.s.p. 15 ml de solução salina. Todas as soluções diluídas (antes de injeção i.v.) foram esterilizadas usando uma unidade de filtro estéril de 0,20 µm. Os valores do pH e da osmolaridade de soluções diluídas foram medidos antes de cada injeção i.v.. Antes da primeira i.v., a osmolaridade (mosm/L) para solução salina, E3, e 911 foram 278, 269, e 308 respectivamente; pH para solução salina, E3, e 911 foram 5,93, 6,76, 6,71 respectivamente. Antes da segunda i.v., a osmolaridade (mosm/L) para solução salina, E3, e 911 foram 280, 270, e 309 respectivamente; pH para solução salina, E3, e 911 foram 5,86, 6,72, e 6,59 respectivamente.

E3 ou 911 ou solução salina foram administrados por injeção de bolus i.v. no Dia 14 e no Dia 19 depois de indução de artrite numa ordem codificada e aleatória com um volume de 5 ml/kg. Ao grupo não artrítico foi administrada por bolus i.v. injeção de solução salina no Dia 14 e no Dia 19 com um volume de 5 ml/kg. Indometacina foi preparada extemporaneamente em 1% de metilcelulose. Indometacina foi administrada por via oral (p.o.) uma vez ao dia durante 10 dias do Dia 14 ao Dia 23 depois de indução de artrite numa ordem codificada e aleatória com um volume de 10 ml/kg.

2. Indução de artrite

No Dia 0 (D 0), foi induzida artrite em 70 ratos por injeção intradérmica na cauda de 0,05 ml de uma suspensão de *Mycobacterium butyricum*. Um grupo de 10 ratos não recebeu qualquer injeção intradérmica (ratos não artríticos). No Dia 14 (D 14), os ratos artríticos foram incluídos no estudo usando os seguintes critérios: todos os

ratos incluídos apresentaram um aumento no volume médio da pata (média do volume das patas esquerda e direita) de pelo menos 0,30 ml comparado com o (média do volume das patas esquerda e direita) no grupo não artrítico (medição do volume da pata conforme descrito a seguir); todos os ratos incluídos apresentaram uma vocalização na flexão suave (medição da reação nociceptiva conforme descrito a seguir); e todos os ratos incluídos apresentaram uma pontuação do índice de artrite de 2 a 3 sobre cada pata traseira (medição do índice de artrite conforme descrito a seguir) (os animais com uma pontuação de 0, 1 ou 4 foram descartados).

3. Peso corporal

Os animais foram pesados uma vez ao dia do Dia 0 ao Dia 24 (exceto durante os dias do fim de semana antes do tratamento: D 1, D 2, D 8, D 9, D10). Todas as medições foram realizadas entre 9:00 e 12:00 da manhã exceto no D 14 (7:30 - 9:00 da manhã) e no D 24 (7:30 - 8:00 da manhã).

3. Medição do volume da pata

O volume da pata traseira direita e esquerda de cada rato (ratos artríticos e não artríticos) foi medido usando um pletismómetro. As medições foram realizadas nos seguintes momentos (depois da indução de artrite): Dia 14 (antes de bolus i.v. ou administração por via oral); e Dia 24 (5 dias depois da última injeção de bolus i.v. ou 24 h depois da última administração por via oral). Todas as medições foram realizadas entre 9:00 e 12:00 horas da manhã. Todos os dados foram colhidos e armazenados pelo *software* WinDas.

4. Índice de artrite

O índice de artrite foi avaliado usando uma pontuação de inflamação para cada pata traseira e pata dianteira (ratos artríticos): Pontuação 0: aspeto normal; Pontuação 1: eritema; Pontuação 2: eritema com ligeiro edema; Pontuação 3: forte inflamação sem anquilose; Pontuação 4:

anquilose. Esta avaliação foi realizada nos seguintes momentos (depois da indução de artrite): Dia 14 (antes de bolus i.v. ou administração por via oral); e Dia 24 (5 dias depois da última injeção de bolus i.v. ou 24 h depois da última administração por via oral). Todas as medições foram realizadas entre 2:00 e 3:00 horas da tarde (D 14), 8:00 e 9:00 horas da manhã (D 24). Todos os dados foram colhidos e armazenados pelo *software* WinDas.

5. Medição da reação nociceptiva (Ensaio de vocalização)

A reação nociceptiva foi avaliada por suave flexão da pata traseira direita e esquerda repetidamente 2 vezes em intervalos de 4 a 5 segundos com um dedo do operador (ratos artríticos). A intensidade do nível de vocalização foi registada para cada animal para cada pata traseira (2 vezes: sobre a pata traseira direita: s1 e s3; 2 vezes: sobre a pata traseira esquerda: s2 e s4). Esta avaliação foi realizada nos seguintes momentos (depois da indução de artrite): Dia 14 (antes de bolus i.v. ou administração por via oral); Dia 18 (antes da segunda injeção de bolus i.v. ou 1 hora depois de administração por via oral); e Dia 24 (5 dias depois da última injeção de bolus i.v. ou 24 h depois da última administração por via oral). Todas as medições foram realizadas entre 9:00 e 12:00 horas da manhã exceto em D 14 (7:30 - 9:00 da manhã) e D 24 (7:30 - 9:00 da manhã).

6. Colheita de sangue para medição da concentração de E3 ou 911 e TGF- β 1 circulante e parâmetros hematológicos

No Dia 24 (depois das medições do volume das patas e o índice de artrite e experimentação de ensaio), sob anestesia geral usando isoflurano (numa mistura de oxigénio e óxido nítrico), as amostras de sangue (cerca de 800 a 1000 μ l) foram colhidas por ação capilar com uma micropipeta a partir do seio retroorbital.

Medição da concentração de E3 ou 911 (grupos 2, 4 e 5): Uma parte da amostra de sangue foi colhida em tubos

contendo Li-Heparina (mantida sobre gelo) e centrifugados a 2500-3000 g durante 10 min. Amostras de plasma (pelo menos 100 µL) foram obtidas, congeladas em nitrogénio líquido, armazenadas a -80 °C. Uma amostra foi ligeiramente hemolisada (rato artrítico tratado com veículo N° 36).

Medição de TGF-β1 circulante (grupos 1-2-3-4-5): Uma parte da amostra de sangue foi colhida em micro tubos para preparação de soro em temperatura ambiente. Depois de colheita da amostra, foi misturado sangue e deixado para coagular durante 30 minutos antes da centrifugação. Os tubos foram centrifugados a cerca de 6000 g durante 3 minutos. Cada amostra de soro (pelo menos 100 µL, exceto pelo rato n° 52 e n° 53) foi dividida em alíquotas e armazenadas a -20 °C até análise da ativação da amostra por TGF-β1. Estas alíquotas (50 frascos) foram mantidas por um período de 6 meses iniciando a partir do fim do estudo. Algumas amostras foram hemolisadas ligeiramente (rato não artrítico tratado com veículo: n° 2, n° 5, n° 9, n° 10; rato artrítico tratado com veículo: n° 53, n° 63; rato artrítico tratado com E3 no. 31, n° 51; rato artrítico tratado com 911: n° 52, n° 62, n° 64). Os níveis de TGF-β1 foram medidos usando *kit* ELISA de TGF-β1 humano (ref. DB100, Lote 212258 e 213610, R&D Systems - França).

Colheita de sangue para parâmetros hematológicos (grupos 1-2-3-4-5: 50 frascos): Uma parte da amostra de sangue foi colhida em tubos contendo K3 - EDTA (pelo menos 100 µl). A determinação dos parâmetros foi realizada no dia da colheita e as amostras não foram armazenadas. Os parâmetros hematológicos incluindo glóbulos vermelhos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito foram medidos com um contador da hematologia celular (D 24). Alguns parâmetros hematológicos não foram medidos devido às amostras coaguladas (rato não artrítico tratado com veículo: n° 10; ratos artríticos tratados com E3: n° 59, n° 67; ratos artríticos tratados com 911: n° 16).

7. Níveis de citocinas das patas

No Dia 24 (5 dias depois da última injeção de bolus i.v. ou 24 horas depois da última administração por via oral) (depois de radiografias de raios-X), cada pata traseira dos animais (ratos artríticos e não artríticos) foi pesada e foi colhida num frasco de polietileno etiquetado. As amostras de tecido foram congeladas em nitrogénio líquido e armazenadas a -80 °C.

Preparação de homogeneizados articulares: Patas traseiras congeladas foram pulverizadas usando um Bio-Pulverizador. As patas traseiras pulverizadas foram em seguida colocadas dentro de um tubo de centrífuga cónico de 50 ml contendo 3 ml de PBS suplementado com 50 µl de coquetel anti-protease e homogeneizadas sobre gelo usando homogeneizador Ultra-Turrax (50% da velocidade máxima). Os homogeneizados foram em seguida centrifugados a 2000 x g durante 15 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram filtrados através de filtros Sartorius de 0,2 µm, divididos em alíquotas e armazenados a -80 °C até a utilização.

Medição dos níveis de citocina: Os níveis de citocina de TNF- α (*kit* ELISA de TNF- α de rato, ref. RTA00, Lote 213718, R&D Systems, França), IL-1 β de rato (*kit* ELISA IL-1 β , ref. RLBO0, lote 212435, R&D Systems, França), IL-6 de rato (*kit* ELISA IL-6, ref. R6000, Lote 211773, 214008 e 214362, R&D Systems, França), e TGF- β 1 Humano (*kit* ELISA TGF- β 1, ref. DB100, lote 212258 e 213610, R&D Systems, França) foram determinados em duplicata, de acordo com o procedimento do fabricante. Alíquotas de homogeneizados das patas traseiras foram armazenadas a -80 °C.

8. Análise por raios-X

No Dia 24, depois da colheita de sangue os animais foram sacrificados e foram obtidas radiografias de raios X (patas traseira) para avaliação de lesões das juntas. A análise de raios-X foi focalizada sobre erosões articulares, o espaço articular, anormalidades do perióstio

sobre ambas as patas traseira. Todas as radiografias foram analisadas olhando sete itens diferentes: a lesão de tecidos moles, deformidade, desmineralização, o espaço articular, erosões, osteogênese e reação periostal. Para cada animal, os seis primeiros itens foram analisados de modo independente olhando a pior pata traseira. A reação periostal foi analisada olhando a cauda. Para cada item a pontuação vai de 0 (normal) a 4 (lesão máxima). Portanto a pontuação total vai de 0 a 28. A interpretação radiográfica foi feita pelo mesmo leitor sem saber nada sobre os animais (tratados ou não tratados).

9. Observações

Um animal (n° 65) morreu em D 23 depois da administração de indometacina (antes da administração em D 23) devido a uma causa desconhecida.

10. Análise e expressão de resultados

Todos os resultados foram reportados como Média \pm E.P.M. de 10 ratos em cada grupo em cada ponto de tempo. O volume das patas foi expresso em ml calculados a partir do valor médio do volume das patas direita e esquerda. A índice de artrite foi calculado a partir da soma da pontuação obtida para cada uma das 4 patas. A reação nociceptiva foi avaliada pela intensidade do nível de vocalização registado para cada animal (média de 4 valores: 2 tempos / pata) em mV. A percentagem de inibição da reação nociceptiva 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 expresso em gramas. O peso das patas traseira (esquerda e direita) foi expresso em gramas. Os níveis de citocina (IL-6, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1) de cada pata traseira foram expressos em pg/ml. Os níveis circulantes de TGF- β 1 foram expressos em pg/ml. O índice radiológico para cada parâmetro (desmineralização,

erosões, reação periostal, lesão de tecidos moles, espaço articular, deformidade por osteogênese) e o índice radiológico total (pontuação total) foram calculados a partir da soma das pontuações obtidas para cada parâmetro. As significâncias intergrupais dos desvios entre os valores do grupo tratado com veículo (ratos artríticos) e o grupo tratado com veículo (ratos não artríticos) foram avaliadas pelo teste t de Student ou Mann-Whitney Rank Sum Test quando igual variância ou ensaio de normalidade falhou, significâncias intergrupais dos desvios entre os valores do grupo tratado com veículo (ratos artríticos) e grupos tratados com E3 e tratados com 911 e tratados com Indometacina foram avaliadas pela análise 1-way de variância ANOVA seguida pelo teste de Dunnett não emparelhado. Uma probabilidade de $P < 0,05$ foi considerada como significativa. Toda a análise estatística foi realizada pelo software Sigmastat™.

Resultados

1. Reação nociceptiva (ensaio de vocalização)

Conforme mostrado no Quadro 11 e na Figura 18, em D 14, a reação nociceptiva foi 4147 ± 331 , 4386 ± 235 , 4644 ± 367 e 4468 ± 143 em grupos artríticos tratados com veículo, tratados com indometacina, tratados com E3, e tratados com 911, respectivamente. Indometacina reduziu fortemente e significativamente a reação nociceptiva depois de 3 mg/kg/dia por via oral (por 10 dias) por cerca de -3768 mV (% de inibição: 71%) e -4353 mV (% de inibição: 74%) em D 18 e D 24, respectivamente comparados com o grupo artrítico tratado com veículo (D 18: 1511 ± 398 contra 5279 ± 326 mV; D 24: 1552 ± 508 contra 5905 ± 345 mV). E3 (1 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) reduziu fortemente e significativamente a reação nociceptiva por cerca de -4167 mV (% de inibição: 79%) e -5905 mV (% de inibição: 100%) em D 18 e D 24, respectivamente comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (D 18: 1112 ± 401 contra 5279 ± 326 mV; D 24: 0 ± 0

contra 5905 ± 345 mV). 911 (10 mg/kg i.v. 2 dias em D 14 e D 19) reduziu fortemente e significativamente a reação nociceptiva por cerca de -3932 (% de inibição: 74%) e -5358 mV (% de inibição: 91%) em D 18 e D 24, respectivamente comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (D 18: 1347 ± 492 contra 5279 ± 326 mV; D 24: 547 ± 307 contra 5905 ± 345 mV).

Quadro 11. Efeitos de E3 e 911 depois de injeção i.v. (2 dias: D 14- D 19) sobre a reação nociceptiva em artrite reumatoide em ratos

| | | Dia | D14 | D 18 | D 24 |
|-----------------------------------|---|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| Ratos Artríticos | | veículo i.v. | 4147 | 5279 | 5905 |
| | | | ±331 | ±326 | ±345 |
| | % de inibição | E3 | 4644 | 1112 | 0 |
| | | 1 mg/kg i.v. | ±367 | ±401* | ±0* |
| | | | 0 | 79 | 100 |
| | % de inibição | 911 | 4468 | 1347 | 547 |
| | | 10 mg/kg i.v. | ±143 | ±492* | ±307* |
| | | | 0 | 74 | 91 |
| % de inibição | Indometacina | | | | |
| | 3 mg/kg por via oral (durante 10 dias) | | 4386 | 1511 | 1552 |
| | | | ±235 | ±398* | ±508 |
| | % de inibição | | 0 | 71 | 74 |

Os valores são expressos em mV como Média ± E.P.M.

n = 10 animais por grupo exceto em D 24 para Indometacina (n = 9)

teste *t* de Dunnett:* P ≤ 0,05 contra ratos artríticos tratados com veículo

2. Peso corporal

Conforme mostrado no Quadro 12 e na Figura 19, foi observada uma acentuada redução no ganho de peso corporal em ratos artríticos em comparação com ratos não artríticos de D 0 a D 14 devido a estabelecimento de artrite. Em D 14 (dia da seleção) os ratos artríticos apresentaram uma

significativa redução no peso comparados com os ratos não artríticos (289 ± 2 contra 217 ± 4 g) (teste t de Student $P < 0,05$). No entanto, não foi detetada diferença significativa no peso (D 14) em todos os grupos artrítico (teste de Dunnett $P > 0,05$). O peso corporal aumentou moderadamente e significativamente no grupo tratado com Indometacina (3 mg/kg/dia durante 10 dias) de D 17 a D 24 com um máximo de cerca de 43 g em D 24 comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (261 ± 5 contra 218 ± 3 g). Depois de tratamento com E3 (1 mg/kg i.v. em D 14 e D 19), o peso corporal aumentou moderadamente e significativamente de D 17 a D 24 com um máximo de cerca de 46 g em D 24 comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (264 ± 5 g contra 218 ± 3 g). Depois de tratamento com 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19), o peso corporal aumentou moderadamente e significativamente de D 18 a D 24 com um máximo de cerca de 47 g em D 24 comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (265 ± 7 contra 218 ± 3 g).

Quadro 12. Efeitos de E3 e 911 depois de injeção i.v. (2 dias: D 14- D 19) sobre o peso corporal em 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 |
| | veículo i.v. | 199 ±2 | 214 ±2 | 221 ±2 | 230 ±2 | 236 ±2 | 241 ±3 | 229 ±6 | 223 ±5 | 218 ±5 | 217 ±4 |
| Ratos Artríticos | 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 | 211 ±5 | 218 ±5 | 227 ±5 | 231 ±5 | 239 ±5 | 234 ±8 | 228 ±7 | 221 ±7 | 218 ±6 |
| | Indometacina 3 mg/kg por via oral 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 |

| Dia | | D0 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D11 | D12 | D13 | D14 |
|-----------------------------|--|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 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 |
| | veículo i.v. | 213 ±4 | 212 ±4 | 211 ±3 | 210 ±3 | 208 ±3 | 210 ±3 | 212 ±3 | 214 ±3 | 216 ±3 | 218 ±3 |
| Ratos Artríticos | 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 por via oral 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 expressos em gramas como Média ± E.P.M. n = 10 animais por grupo exceto em D 23 e D 24 (n = 9) para Indometacina teste t de Dunnett: * P ≤ 0,05 contra ratos artríticos tratados com veículo

3. Volume das patas

Em D 14, foi realizada uma randomização de modo a obter grupos homogêneos em termos de volume da pata. Conforme mostrado no Quadro 13, em D 14, o volume da pata traseira (média do volume da pata direita e esquerda) foi significativamente maior no grupo artrítico do que no grupo não artrítico ($2,10 \pm 0,05$ contra $1,44 \pm 0,02$ ml (teste t de Student $P < 0,05$)). Indometacina (3 mg/kg/dia por via oral durante 10 dias) reduziu significativamente o volume das patas por cerca de -0,75 ml (D 24) comparado com o grupo artrítico tratado com veículo ($1,59 \pm 0,03$ ml contra $2,34 \pm 0,08$ ml). E3 (1 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) aumentou ligeiramente e significativamente o volume das patas por cerca de 0,37 ml comparado com o grupo artrítico tratado com veículo ($2,71 \pm 0,09$ ml contra $2,34 \pm 0,08$ ml). 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) aumentou ligeiramente e significativamente o volume das patas por cerca de 0,36 ml comparado com o grupo artrítico tratado com veículo ($2,70 \pm 0,11$ ml contra $2,34 \pm 0,08$ ml).

Quadro 13. Efeitos de E3 e 911 depois de injeção i.v. (2 dias: D 14 - D 19) sobre o volume das patas em artrite reumatoide em ratos

| | Dia | D14 | D24 |
|-----------------------------|---|------------|-------------|
| Ratos Não Artríticos | veículo i.v. | 1,44 ±0,02 | 1,47 ±0,02 |
| Ratos Artríticos | veículo i.v. | 2,10 ±0,05 | 2,34 ±0,08 |
| | E3 1 mg/kg i.v. | 2,06 ±0,03 | 2,71 ±0,09* |
| | 911 10 mg/kg i.v. | 2,02 ±0,07 | 2,70 ±0,11* |
| | Indometacina 3 mg/kg por via oral durante 10 dias | 2,08 ±0,06 | 1,59 ±0,03* |

Os valores são expressos em ml como Média ± E.P.M.

n = 10 animais por grupo exceto em D 24 para Indometacina (n = 9)

teste *t* de Dunnett:* P ≤ 0,05 contra ratos artríticos tratados com veículo

4. Índice de artrite

Conforme mostrado no Quadro 14, no D 14, o índice de artrite foi de 10,1 ± 0,8, 8,7 ± 0,6, 10,2 ± 0,4 e 9,4 ± 0,7 e em grupos artríticos tratados com veículo, tratados com indometacina, tratados com E3, e tratados com 911, respectivamente. Indometacina reduziu fortemente e significativamente o índice de artrite depois de 3 mg/kg/dia por via oral (por 10 dias) por um máximo de cerca de -8,0 comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (2,7 ± 0,7 contra 10,7 ± 0,6). E3 (1 mg/kg i.v. no D 14 e D 19) não afetou o índice de artrite comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (11,4 ± 0,4 contra 10,7 ± 0,6). 911 (10 mg/kg i.v. no D 14 e D 19) não afetou o índice de artrite comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (10,9 ± 0,7 contra 10,7 ± 0,6).

Quadro 14. Efeitos de E3 e 911 depois de injeção i.v. (2 dias: D 14- D 19) sobre o índice de artrite em artrite reumatoide em ratos

| | Dia | D14 | D24 |
|-------------------|--|------------------|-------------------|
| Ratos | veículo i.v. | 10,1 ±0,8 | 10,7 ±0,6 |
| Artríticos | 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 por via oral durante 10 dias | 8,7 ±0,06 | 2,7 ±0,03* |

Os valores são expressos como Média ± E.P.M. (pontuação) n = 10 animais por grupo exceto para Indometacina (n = 9) teste t de Dunnett:* P ≤ 0,05 contra ratos artríticos tratados com veículo

5. Níveis de citocina das patas

Conforme mostrado no Quadro 15, em D 24, os níveis de citocina nas patas esquerda e direita estavam aumentados no grupo artrítico tratado com veículo por um máximo de cerca de 3,5 (IL-1 β), 4 (TNF- α) e 1,8 (TGF- β 1) vezes comparado com o grupo não artrítico tratado com veículo. Não foi observada diferença significativa para os níveis de IL-6, na pata direita e esquerda, entre os dois grupos. Os níveis de citocina do grupo artrítico foram semelhantes na pata esquerda e direita: 259,7 ± 38,5 contra 219,2 ± 32,4, 4802,8 ± 365,5 contra 4007,1 ± 380,4, 17,8 ± 1,6 contra 18,6 ± 1,9 e 9735,0 ± 1219,8 contra 9161,4 ± 846,1 pg/ml para IL-6, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1 respectivamente. Indometacina reduziu ligeiramente, mas significativamente, o nível de TGF-1 β na pata direita depois de 3 mg/kg/dia por via oral (por 10 dias) por cerca de 1,3 vezes, comparada com o grupo artrítico tratado com veículo (7057,4 ± 335,6 contra 9161,4 ± 846,1), ao passo que não modificou os

níveis de IL-6, TNF- α ou IL-1 β . Foi observado um efeito semelhante mas não significativo na pata esquerda. E3 (1 mg/kg i.v. no D 14 e D 19) não afetou os níveis de IL-6, IL-1 β , TNF- α ou TGF- β 1, em ambas as patas, comparado com o grupo artrítico tratado com veículo. 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) aumentou o nível de IL-1 β na pata direita comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (6215,3 \pm 666,7 contra 4007,1 \pm 380,4). Não teve nenhum efeito sobre outros níveis de citocina em ambas as patas.

Quadro 15. Efeito de E3 e 911 depois de injeção i.v. (2 dias em D 14 e D 19) sobre os níveis de citocina das patas em ratos artríticos reumatoides

Níveis de citocina das patas esquerdas

| 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 por via oral |
| IL-6 | 298,6 \pm 35,6 | 259,7 \pm 38,5 | 234,4 \pm 35,2 | 262,5 \pm 42,5 | 249,7 \pm 60,4 |
| IL-1β | 1383,0 \pm 57,9 | 4802,8 \pm 365,5 | 5060,0 \pm 473,5 | 5500,8 \pm 625,3 | 4029,1 \pm 449,9 |
| TNF-α | 4,3 \pm 2,9 | 17,8 \pm 1,6 | 23,6 \pm 2,5 | 29,9 \pm 4,8 | 29,9 \pm 3,6 |
| TGF-β1 | 5264,7 \pm 209,2 | 9735,0 \pm 1219,8 | 9796,7 \pm 491,2 | 11053,5 \pm 713,3 | 7708,2 \pm 293,9 |

Níveis de citocina das patas direitas

| 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 por via oral |
| IL-6 | 286,4 \pm 76,1 | 219,2 \pm 32,4 | 214,6 \pm 47,2 | 284,9 \pm 38,9 | 295,9 \pm 47,8 |

| 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 por via oral |
| IL-1β | 1342,1 $\pm 86,1$ | 4007,1 $\pm 380,4$ | 4853,5 $\pm 605,0$ | 6215,3 $\pm 666,7^*$ | 3884,4 $\pm 534,4$ |
| TNF-α | 15,7 $\pm 4,8$ | 18,6 $\pm 1,9$ | 21,5 $\pm 2,5$ | 33,4 $\pm 5,7$ | 30,6 $\pm 5,7$ |
| TGF-$\beta 1$ | 5024,8 $\pm 148,4$ | 9161,4 $\pm 846,1$ | 9362,7 $\pm 423,4$ | 10861,2 $\pm 604,6$ | 7057,4 $\pm 335,6^*$ |

Os valores são expressos em pg/ml, como Média \pm E.P.M.

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

teste t de Dunnett:* P \leq 0,05 contra ratos artríticos tratados com veículo

6. Medição de TGF- $\beta 1$ circulante

Conforme mostrado no Quadro 16, em D 24, o nível sérico de TGF- $\beta 1$ estava aumentado no grupo artrítico tratado com veículo comparado com o grupo não artrítico tratado com veículo (81715,7 \pm 1984,1 contra 60269,9 \pm 2142,8). Indometacina reduziu significativamente o nível sérico de TGF- $\beta 1$ depois de 3 mg/kg/dia por via oral (por 10 dias) por cerca de 1,5 vezes, comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (57222,2 \pm 3194,1 contra 81715,7 \pm 1984,1). E3 (1 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) e 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) reduziu significativamente o nível sérico de TGF- $\beta 1$ de modo que o nível de citocina nos grupos tratado com E3 e tratado com 911 foram comparáveis com os observados no grupo não artrítico tratado com veículo (69408,8 \pm 3926,7 e 67214,5 \pm 3649,4 respectivamente, contra 60269,9 \pm 2142,8).

Quadro 16. Efeito de E3 e 911 depois de injeção i.v. (2

dias em D 14 e D 19) sobre os níveis séricos de TGF- β 1 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 por via oral |
| 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 expressos em pg/ml, como Média \pm E.P.M.

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

teste t de Dunnett:* P \leq 0,05 contra ratos artríticos tratados com veículo

7. Parâmetros hematológicos

Conforme mostrado no Quadro 17, os parâmetros hematológicos tais como glóbulos vermelhos e plaquetas foram maiores em ratos artríticos tratados com veículo em comparação com ratos não artríticos tratados com veículo (teste t de Student P<0,05), ao passo que as glóbulos vermelhos, hemoglobina e hematócrito (teste t de Student P>0,05) foram inalterados. Indometacina não afetou os parâmetros sanguíneos depois de 3 mg/kg/dia por via oral (por 10 dias) comparado com o grupo artrítico tratado com veículo. E3 (1 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) não afetou os parâmetros sanguíneos comparado com o grupo artrítico tratado com veículo. 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) não afetou os parâmetros sanguíneos em comparação com o grupo artrítico tratado com veículo.

Quadro 17. Efeitos de E3 e 911 depois de injeção i.v. (2 dias em D 14 e D 19) sobre parâmetros sanguíneos na artrite reumatoide em ratos (Medição em D 24)

| <i>Dia</i> | | Leucócitos 10 ³ /mm ³ | Glóbulos vermelhos 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 |
| | 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 |
| Ratos Artríticos | E3 1 mg/kg i.v. | 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 |
| | 911 10 mg/kg i.v. | 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 |
| | Indometacina 3 mg/kg por via oral durante 10 dias | 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 |

Os valores são expressos como Média ± E.P.M.

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

7. Peso da pata traseira

Conforme mostrado no Quadro 18, o peso da pata traseira esquerda e direita foi maior nos ratos artríticos tratados com veículo do que nos ratos não artríticos tratados com veículo (3,43 ± 0,11 contra 1,98 ± 0,01 e 3,32 ± 0,12 contra 1,99 ± 0,02 g, respetivamente) (teste t de Student ou Mann-Whitney P < 0,05). Indometacina reduziu significativamente o peso das patas traseiras depois de 3 mg/kg/dia por via oral (por 10 dias) comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (pata traseira esquerda: 2,23 ± 0,04 contra 3,43 ± 0,11 g; pata traseira direita: 2,20 ± 0,05 contra 3,32 ± 0,12 g). E3 (1 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) somente aumentou significativamente o peso da pata traseira esquerda comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (pata traseira esquerda: 3,86 ± 0,14 contra 3,43 ± 0,11 g; pata traseira direita: 3,72 ± 0,13 contra

3,32 ± 0,12 g). 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) somente aumentou significativamente o peso da pata traseira direita comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (pata traseira esquerda: 3,73 ± 0,12 contra 3,43 ± 0,11 g; pata traseira direita: 3,83 ± 0,15 contra 3,32 ± 0,12 g).

Quadro 18. Efeitos de E3 e 911 depois de injeção i.v. (2 dias em D 14 e D 19) sobre o peso das patas traseiras na artrite reumatoide em ratos (Medição em D 24)

| | | 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 | 3,72 |
| | 1 mg/kg i.v. | ±0,14* | ±0,13 |
| | 911 10 mg/kg i.v. | 3,73 ±0,12 | 3,83 ±0,15* |
| | Indometacina 3 mg/kg por via oral durante 10 dias | 2,23±0,04* | 2,20 ±0,05* |

Os valores são expressos em gramas como Média ± E.P.M. n = 10 animais por grupo exceto para Indometacina (n = 9) teste t de Dunnett:* P ≤ 0,05 contra ratos artríticos tratados com veículo

8. Análise por raios-X

Conforme mostrado no Quadro 19, foi observado uma pontuação total de 0,0 ± 0,0 nos ratos não artríticos tratados com veículo. Os ratos artríticos tratados com veículo têm uma pontuação total de 15,1 ± 1,3 com altas pontuações para desmineralização (2,4 ± 0,3), erosões (2,7 ± 0,3), lesão de tecidos moles (3,1 ± 0,2) e espaço articular (3,3 ± 0,2), uma pontuação moderada para reação periosteal (1,0 ± 0,3), osteogênese (0,8 ± 0,2) e deformidade (1,8 ± 0,2). Indometacina (3 mg/kg/dia por via

oral durante 10 dias) reduziu forte e significativamente a pontuação total por cerca de 10,7 em comparação com ratos artríticos tratados com veículo ($4,4 \pm 0,9$ contra $15,1 \pm 1,3$). E3 (1 mg/kg i.v. no D 14 e D 19) não afetou a pontuação total comparada com o grupo artrítico tratado com veículo ($14,2 \pm 1,3$ contra $15,1 \pm 1,3$). 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) não afetou a pontuação total comparado com o grupo artrítico tratado com veículo ($15,4 \pm 10$ contra $15,1 \pm 1,3$).

Quadro 19. Efeitos de E3 e 911 após injeção i.v. (2 dias em D 14 e D 19) sobre parâmetros de raios-X em artrite reumatoide em ratos

| Dia | | Desmineralização | Erosões | Reação Periosteal | Lesão de tecidos moles | Espaço articular | osteogênese | Deformidade | Pontuação TOTAL |
|----------------------|------------------------------------|------------------|----------|-------------------|------------------------|------------------|-------------|-------------|-----------------|
| Ratos Mão 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 | 0,0 ±0,0 |
| | 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 |
| Ratos Artríticos | 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 |
| | Indometacina 3 m g/kg por via oral | 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 expressos como Média ± E.P.M. (pontuação).
n = 10 animais por grupo exceto para Indometacina (n = 9)
teste t de Dunnett: * P ≤ 0,05 contra ratos artríticos tratados com veículo

Conclusão

Sob as condições experimentais descritas acima, E3 (1 mg/kg i.v. 2 dias: D 14 - D 19) e 911 (10 mg/kg i.v. 2 dias: D 14 - D 19) apresentaram fortes efeitos analgésicos, mas não apresentaram efeitos anti-inflamatórios significativos neste modelo de artrite.

Exemplo 8: Efeitos de diferentes doses de anticorpo anti-NGF E3 num modelo de artrite reumatoide em rato

A capacidade de E3 para produzir redução na dor em ratos artríticos foi adicionalmente investigada examinando a relação da reação da dose entre administração de E3 e redução da dor. Os ratos foram tratados com adjuvante para induzir artrite conforme descrito acima. Dez ratos não injetados com adjuvante foram usados como controlos não artríticos. Catorze dias depois da injeção de adjuvante, os animais foram qualificados no estudo com base nos critérios determinados acima, randomizados em oito grupos de dez ratos e testados para a intensidade de sua reação de vocalização. Em seguida eles foram dosados dia 14 com solução 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 para sua reação de vocalização nos dias 16, 18, 20, e 24. Os animais foram novamente doseados com solução salina ou a mesma dose de E3 no dia 18 depois da experiência de vocalização. Os animais foram também pesados a cada dia, iniciando no dia 14. Portanto, os animais foram dosados duas vezes com uma dada dose do anticorpo ou solução salina nos dias 14 e 18, e avaliados para dor cinco vezes, nos dias 14, 16, 18, 20 e 24. Os são mostrados nos Quadros 20 a 22 e nas Figuras 20 a 22.

Quadro 20. Efeitos de diferentes doses de E3 sobre reação nociceptiva (intensidade da vocalização) em ratos artríticos reumatoides. Os valores da intensidade da vocalização são expressos em mV como média \pm e.p.m.

| | | 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 | 1129,25 | 981,75 | 1007,28 | 963,18 | 1159,30 | 1191,58 | 1067,00 | 896,25 |
| | e.p.m. | 143,06 | 71,00 | 66,50 | 62,12 | 132,76 | 123,44 | 69,73 | 57,53 |
| Dia 16 | média | 1042,85 | 825,60 | 576,88 | 448-43 | 283,71 | 151,85 | 98,62 | 79,18 |
| | e.p.m. | 130,51 | 57,94 | 49,71 | 81,01 | 60,00 | 26,08 | 29,17 | 27,30 |
| Dia 18 | média | 968,10 | 427,43 | 334,45 | 292,52 | 262,96 | 194,19 | 174,13 | 200,42 |
| | e.p.m. | 117,85 | 48,55 | 35,10 | 52,36 | 62,32 | 53,56 | 86,61 | 120,15 |
| Dia 20 | média | 942,18 | 448,00 | 313,13 | 209,48 | 79,74 | 66,27 | 71,23 | 63,57 |
| | e.p.m. | 100,69 | 33,73 | 61,98 | 24,43 | 33,18 | 31,34 | 42,37 | 23,47 |
| Dia 24 | média | 913,68 | 724,50 | 596,38 | 513,60 | 432,45 | 176,32 | 19,21 | 12,35 |
| | e.p.m. | 131,29 | 115,90 | 44,76 | 63,67 | 70,38 | 66,61 | 10,14 | 12,35 |

O efeito de tratar animais com várias doses de anticorpo anti- NGF E3 sobre a vocalização induzida por dor (dados mostrados no Quadro 20) foi analisado estatisticamente usando "bidirecional" (ANOVA) para comparar os resultados obtidos emparelhados entre animais artríticos tratados com veículo com aqueles tratados com uma dada dose do anticorpo E3. Houve um efeito altamente significativo em todos os níveis de E3 testados ($p < 0,0001$). Mesmo na menor dose testada (0,003 mg/kg de E3), a diferença na vocalização foi significativa ($p < 0,0001$).

Conforme mostrado no Quadro 20 e na Figura 20, de acordo com as experiências acima, o tratamento com anticorpo E3 a 1 mg/kg mostrou um alívio rápido e forte da dor. Dentro de dois dias (o ponto de tempo mais cedo testado) a intensidade da vocalização baixou durante 90%. Tratamento com menores concentrações de E3 também proporcionou forte alívio da dor, embora em menores doses o

alívio da dor levou um pouco mais de tempo para se manifestar. É provável que a redução aparente na eficácia no dia 24 de todas exceto as maiores doses testadas sejam devidas a uma redução no nível real do nível plasmático de E3 secundário a uma reação imune pelos ratos objetos de experiência. É evidente que doses tão baixas quanto 0,003 mg/kg proporcionam pelo menos alívio parcial da dor neste modelo.

Quadro 21. Efeitos de diferentes doses de E3 sobre o peso corporal em ratos artríticos reumatóides (normalizado até ao dia 14).

| Dia | Não artrítico | | Veículo | | 0,003 mg/kg | | 0,01 mg/kg | | 0,03 mg/kg | |
|-----|---------------|--------|---------|--------|-------------|--------|------------|--------|------------|--------|
| | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. |
| 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 | E.P.M. | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. |
| 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 |

Quadro 22. Efeitos de diferentes doses de E3 sobre o peso corporal em ratos artríticos reumatoides (normalizado até ao dia 0).

| Dia | Não artrítico | | veículo | | 0,003 mg/kg | | 0,01 mg/kg | | 0,03 mg/kg | |
|-----|---------------|--------|---------|--------|-------------|--------|------------|--------|------------|--------|
| | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. |
| 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 | 118,43 | 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 | E.P.M. | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. |
| 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 |

| Dia | 0,1 mg/kg | | 0,3 mg/kg | | 1,0 mg/kg | | 5,0 mg/kg | |
|-----|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
| | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. | Média | E.P.M. |
| 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 |
| 76 | 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 anti- NGF E3 sobre o peso corporal foi analisado estatisticamente usando ANOVA bidirecional para comparar os resultados obtidos emparelhados entre animais artríticos tratados com veículo com aqueles tratados com uma dada dose do anticorpo E3. Usando dados normalizados para o peso no dia 14 (Quadro 21), doses de 0,03 mg/kg de E3 resultaram numa alteração significativa no peso corporal ($p < 0,005$). Em toda a dose maior de E3, a diferença entre animais artríticos tratados e não tratados foi significativa ($p =$ ou $< 0,0001$). Usando dados normalizados para o peso no dia 0 (Quadro 22), dose de 0,03 mg/kg de E3 resultou numa alteração significativa no peso corporal ($p < 0,002$). Em toda a dose maior de E3, a diferença entre animais artríticos tratados e não tratados foi significativa ($p < 0,0001$).

Novamente de acordo com estudos anteriores, ratos tratados com E3 apresentaram menos perda de peso aparente do que ratos artríticos tratados com solução salina (Quadro 22 e Figura 22). De facto, ratos tratados com altas doses do anticorpo E3 foram recuperando a perda de peso anterior, e na verdade ganhando peso mais rápido do que suas coortes

não artríticas (Quadro 21 e Figura 21).

Exemplo 9. Efeitos analgésicos de anticorpo anti-NGF E3 em pacientes com dor moderada a grave de osteoartrite do joelho

Neste estudo de escalonamento da dose, randomizado, controlado por placebo, duplo-cego, efeitos analgésicos de doses intravenosas únicas (3 µg/kg, 10 µg/kg, 30 µg/kg, 100 µg/kg, ou 300 µg/kg) de anticorpo anti-NGF E3 foram comparados com placebo em pacientes com dor moderada a grave de osteoartrite do joelho. Adultos do sexo masculino e do sexo feminino (idades entre 35 a 65) que sofreram dor moderada a grave de osteoartrite do joelho, mas tendo de outro modo boa saúde global foram registados no estudo. Durante o período de rastreio, foi exigido dos pacientes que descontinuassem as medicações contra artrite tais como AINEs, inibidores da ciclooxigenase tipo-2 (COX-2), e opiáceos pelo menos 14 dias antes da administração de anticorpo anti-NGF E3. Os pacientes foram autorizados a usar medicações de auxílio de acetaminofeno ou ibuprofeno com algumas restrições com base em achados laboratoriais ou histórico médico passado. Alguns pacientes tomaram medicações de auxílio durante o estudo, mas as medicações de auxílio não foram consumidas durante 2 dias antes e depois da administração de anticorpo anti-NGF E3.

Trinta e quatro pacientes foram admitidos no estudo e avaliados como pacientes internados para os Dias de Estudo -1, 1 e 2. A administração de anticorpos anti-NGF E3 ocorreu na manhã do Dia 1. Foram usados diários eletrónicos para registar o índice de dor do joelho e utilização de medicação de auxílio na clínica e em casa. Dez pacientes foram tratados com placebo. Vinte e quatro pacientes foram tratados com anticorpo anti-NGF E3: quatro pacientes por nível de dose para 3 µg/kg (coorte 1), 10 µg/kg (coorte 2), e 30 µg/kg (coorte 3); e seis pacientes por nível de dose para 100 µg/kg (coorte 4) e 300 µg/kg (coorte 5). O placebo

usado foi Injeção de Cloreto de Sódio a 0,9% estéril, USP (solução salina normal). Anticorpo anti-NGF E3 foi uma formulação líquida congelada consistindo em 10 mg/ml de anticorpo numa solução aquosa de 10 mM de histidina, 275 mM de sacarose, 0,01% de polissorbato 20, pH 6,0. Uma hora antes da administração IV, anticorpo congelado foi degelado e diluído em Injeção de Cloreto de Sódio, USP. O volume para cada paciente foi calculado com base no peso do paciente Dia - 1 e nível de dose atribuída, variando de 3-6 cc para a coorte 1, 10-20 cc para a coorte 2, 30-60 cc para a coorte 3, e 100 cc para a coorte 4 e a coorte 5. Para as coortes 1 e 2, o anticorpo E3 foi administrado por um bolus IV lento durante 3 a 5 minutos, seguido por um jato IV de 5 cc de Injeção de Cloreto de Sódio, USP. Para as coortes 3-5, anticorpo E3 foi administrado a 100 cc/hora através de bomba de infusão, seguido por um jato IV de 5 cc de Injeção de Cloreto de Sódio, USP e descontinuação do IV. Dentro de cada coorte, o placebo (Injeção de Cloreto de Sódio, USP) foi administrado por bolus lento ou infusão contínua do mesmo modo que o anticorpo E3.

Depois de dois dias hospitalizados, os pacientes tiveram alta. Dependendo da coorte do nível de dose, eles continuaram a ser avaliados para níveis de dor durante 28 dias depois da administração de anticorpo E3 (Coortes 1, 2, e 3) ou até 181 dias depois da administração de anticorpo E3 (Coortes 4 e 5). Foi feita avaliações periódicas de segurança durante 181 dias em todos os pacientes.

Os efeitos analgésicos foram avaliados antes da dosagem e em múltiplos tempos depois da administração de anticorpo E3. VAS eletrônico validado variando de 0-100 com 101 pontos de resolução foi usado para índice da dor do joelho corrente. Os pacientes foram informados 4 vezes diariamente e instruídos a indicar o nível de dor de artrite no índice do joelho naquele momento. VAS eletrônico validado variando de 0-100 com 101 pontos de resolução

também foi usado para índice da dor do joelho durante deambulação. VAS para índice da dor do joelho durante deambulação foi completado diariamente, concorrente com o quarto índice corrente de VAS da dor do joelho.

Foi emitido diário eletrônico para colheita de dados no dia -8 e foi feita uma avaliação de rastreo de 7 dias da aceitação do diário eletrônico do dia -8 ao dia -2 para determinar o sucesso na utilização dos diários eletrônicos para um dado indivíduo. Os indivíduos foram instruídos a completar 4 diários por dia. O VAS médio registado durante o período de rastreo é usado como avaliação inicial para avaliação da eficácia.

Também foi usada a WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Scale) 3,1 Osteoarthritis Index Versão VA.1[®] para avaliar a dor de artrite. WOMAC 3.1[™] consiste em 24 questões divididas em 3 domínios: dor (5 questões), rigidez (2 questões), e função física (17 questões). Bellamy *et al.*, J. Rheumatol 15:1833-40 (1988); e Bellamy, Semin. Arthritis Rheum. 18:14-7 (1989). O domínio da função física proporciona informação da capacidade de realizar as atividades da vida diária. Os pacientes realizaram o ensaio diretamente no diário eletrônico durante visitas clínicas designadas, usando VAS eletrônico validado variando de 0-100 com 101 pontos de resolução. Cada domínio foi classificado determinando as médias das pontuações de VAS das questões componentes. O WOMAC 3.1[™] total foi classificado determinando as médias das pontuações de cada um dos 3 domínios. Os pacientes também foram instruídos a relatar medicação de auxílio usada através do diário eletrônico.

O resultado foi avaliado como alteração da avaliação inicial (nível de dor durante o período de rastreo), expresso como diferença da intensidade da dor (PID) ou soma da diferença da intensidade da dor (SPID) para diferentes níveis de dose. As alterações da avaliação inicial nas

medições da atividade foram analisadas usando uma análise do modelo de covariância (ANCOVA) com tratamento como o fator principal e dor basal como um co-variado. Para médias e alterações médias, foram feitas comparações do anticorpo E3 com placebo usando ensaio de Dunnett. Foi usado ensaio de tendência de Tukey-Ciminera-Heysel para avaliar a relação dose-resposta.

Conforme mostrado na Figura 24, a redução da intensidade da dor diária média depois da única administração de anticorpo anti-NGF E3 foi observada em cada dose testada. De modo geral, o efeito na redução da intensidade da dor durou mais tempo no grupo tratado com maior dose (30 µg/kg, 100 µg/kg e 300 µg/kg) do que no grupo tratado com menor dose (3 µg/kg e 10 µg/kg). Conforme mostrado na Figura 25, as reduções na intensidade da dor duraram por pelo menos 80 dias depois da administração de 100 µg/kg de E3.

A Quadro 23 abaixo mostra a soma das diferenças da intensidade da dor (SPID) para cada dosagem de E3 para os dias 2-8, dias 2-14, dias 2-21, e dias 2-28 comparada com níveis basais. ANCOVA foi usado para análise estatística. O Quadro 23 indica que a redução da dor foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) depois de administração única de anticorpo anti-NGF E3.

Quadro 23. Soma das diferenças da intensidade da dor para intervalos de tempo variáveis comparada com a avaliação inicial.

| | Dias 2-8 | Dias 2-14 | Dias 2-21 | Dias 2-28 |
|-----------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Placebo | -269 | -486 | -758 | -1055 |
| 3 µg/kg | -572 (0,11) (0,43) | -956 (0,18) (0,62) | -1048 (0,63) (0,99) | -1067 (0,99) (1,00) |
| 10 µg/kg | -671 (0,04) (0,17) | -1174 (0,05) (0,24) | -1623 (0,15) (0,55) | -2020 (0,29) (0,81) |

| | Dias 2-8 | Dias 2-14 | Dias 2-21 | Dias 2-28 |
|------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 30 µg/kg | -733 (0,02) (0,09) | -1371 (0,02) (0,08) | -2042 (0,04) (0,17) | -2566 (0,10) (0,40) |
| 100 µg/kg | -766 (< 0,01) (0,02) | -1403 (<0,01) (0,02) | -1996 (0,02) (0,10) | -2726 (0,04) (0,17) |
| 300 µg/kg | -769 (<0,01) (0,02) | -1340 (< 0,01) (0,04) | -1869 (0,04) (0,17) | -2521 (0,07) (0,29) |
| Todos | -713 (<0,01) (< 0,01) | -1269 (<0,01) (< 0,01) | -1752 (0,01) (0,06) | -2254 (0,04) (0,18) |

Foi feita análise estatisticamente sem ajuste e com ajuste para múltiplas comparações. A primeira linha de valores de p dentro de parênteses para cada intervalo de tempo foi sem ajuste; a segunda linha de valores de p dentro de parênteses foi com ajuste de Dunnett.

Conforme mostrado na Figura 26, a percentagem de redução máxima em SPID pela administração única de anticorpo anti-NGF E3 atingiu cerca de 45% até cerca de 65% do dia 2 ao dia 14 para cada dose de E3 testada, e atingiu cerca de 45% até cerca de 60% do dia 2 ao dia 28 para dose de 10 µg/kg, 30 µg/kg, 100 µg/kg, e 300 µg/kg de E3.

Conforme mostrado na Figura 27, a administração de anticorpo anti-NGF E3 também reduziu a pontuação WOMAC do dia 1 ao dia 28. A pontuação de dor, função física e rigidez foi reduzido significativamente em dose de 100 µg/kg de E3. Estes dados indicam que a administração única de anticorpo anti-NGF não somente reduz a dor, mas também melhora a função física e a rigidez em pacientes tendo osteoartrite.

Depósito de Material Biológico

Os materiais seguintes foram depositados junto à

Coleção Americana de Culturas Celulares, 10801 University Boulevard, Manassas, Virgínia, EUA (ATCC):

| Material | | <u>Nº de Acesso ATCC</u> | <u>Data de Depósito</u> |
|-----------------|---------------------|--------------------------|-------------------------|
| Eb.911.3E | cadeia leve de E3 | PTA-4893 | 8 de janeiro de 2003 |
| Eb.pur.911.3E | cadeia leve de E3 | PTA-4894 | 8 de janeiro de 2003 |
| Db.911.3E | cadeia pesada de 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 feito segundo as estipulações do Tratado de Budapest acerca do Reconhecimento Internacional do Depósito de Microrganismos para fins de Procedimento de Patente e de Regulamentações subordinadas (International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Tratado de Budapest)). Este garante a manutenção de uma cultura viável do depósito durante 30 anos da data de depósito. O depósito será tornado disponível pela ATCC sob os termos do Tratado de Budapest, e estará indivíduo a um acordo entre Rinat Neuroscience Corp. e a ATCC, o qual garante disponibilidade permanente e irrestrita da progénie da cultura do depósito para o público na publicação da Patente US pertinente ou na exposição ao público de qualquer pedido de Patente US ou estrangeira, qualquer que venha primeiro, e assegura disponibilidade da progénie para alguém determinado pelo Comissário de Patentes de Marcas Registadas dos Estados Unidos (U.S. Commissioner of Patents and Trademarks) a ser intitulado para isso de acordo com 35 USC Section 122 e as regras do Comissário de acordo para isso (incluindo 37 CFR Section 1,14 com particular referência a 886 OG 638).

O cessionário do presente pedido concordou que se uma

cultura dos materiais em depósito morresse ou fosse perdida ou destruída quando cultivada sob condições adequadas, os materiais serão prontamente substituídos sob notificação com outros dos mesmos. A disponibilidade do material depositado não deve ser considerada como uma licença para prática da divulgação em contravenção dos direitos concedidos sob a autoridade de qualquer governo de acordo com suas leis de patente.

Sequências de anticorpos

Região variável de cadeia pesada (CDRs Kabat estão sublinhadas; CDRs Chothia estão **EM NEGRITO E EM ITÁLICO**)
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDY
NSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSIYFDYWGQGTL
 VTVS (SEQ ID NO:1)

Região variável de cadeia leve (CDRs Kabat estão sublinhadas; CDRs Chothia estão **EM NEGRITO E EM ITÁLICO**)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTCRASQSSISNNLNWYQQKPKAPKLLIYYTSRFHSGVP
SRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO:2)

CDRs estendidas de cadeia pesada E3

- CDRH1: GFSLIGYDLN (SEQ ID NO: 3)
- CDRH2: IIWGDGTTDYN SAVKS (SEQ ID NO: 4)
- CDRH3: GGYWYATSIYFDY (SEQ ID NO: 5)

CDRs estendidas de cadeia leve E3

- CDRL1: RASQSSISNNLN (SEQ ID NO: 6)
- CDRL2: YTSRFHS (SEQ ID NO: 7)
- CDRL3: QQEHTLPYT (SEQ ID NO: 8)

CDRs estendidas 911 de anticorpo monoclonal de ratinho

CDRs estendidas de cadeia pesada 911

- CDRH1: GFSLIGYDIN (SEQ ID NO: 9)
- CDRH2: MIWGDGTTDYN SALKS (SEQ ID NO: 10)
- CDRH3: GGYYYGTSYIYFDY (SEQ ID NO: 11)

CDRs estendidas de cadeia leve 911

- CDRL1: RASQDISNHLN (SEQ ID NO: 12)
- CDRL2: YISRFHS (SEQ ID NO: 13)
- CDRL3: QQSKTLPYT (SEQ ID NO: 14)

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada E3 (total)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGHWGDGTTD
 YNSAVKSRVTISKDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFDYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPP
 CPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID
 NO:16)

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISINNLNHWYQOKPGKAPKLLIYYTSRFHSGV
 PSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYCQQEHTLPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
 STLTLTKADYEEKHXVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:17)

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

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGCEAAGGACTGGTGAAGCCTTCCGAGACCCTGT.....
 CCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCCTCACTTATCGGGCTATGATCTTAACTGGATCC
 GACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGGTGATGGAA
 CCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCCGCGTCACCATCTCAAAAAGACACCTCCA
 AGAACCAGTTCCTCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTA
 TTACTGTGCGAGAGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTACTACTTTGACTACTGG
 GGCCAGGGCACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCTGTCTT
 CCCACTGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCC
 TGGTCAAGGACTACTTCCAGAACCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTG
 ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTCTCAGTCTCTCAGGTCTCTACTCCCTC
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAA
 CGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTGACAAAGACCGTGGAGAGAAAAGTGT
 TGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGCCCTCCAGTGGCCGGACCATCCGTGTCTCT
 GTTCCCTCCAAAGCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCAGAACCCCAAGGGTACCT
 GTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATG
 TGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGAGAGGAGCAGTTCA
 ACTCCACCTTCCAGAGTGGTGAGCGTGTCTGACCGTGGTGCACCAAGGACTGGCTGAA
 CGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGCATCGA
 GAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATACCCTG
 CCACCATCCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGA
 AGGGATTCTATCCATCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGA
 GAACAATAAGACCACCCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGATCCTTCTTCTCTGTA
 TTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTCTCTTGT
 TCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATAACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTC
 TCCAGGAAAAGTAA (SEQ ID NO: 65)

Sequência de nucleótidos de domínio variável de cadeia pesada 3E

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGAGACCCTGT
 CCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCCTCACTTATCGGGCTATGATCTTAACTGGATCC
 GACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGGTGATGGAA
 CCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCCGCGTCACCATCTCAAAAAGACACCTCCA
 AGAACCAGTTCCTCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTA
 TTACTGTGCGAGAGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTACTACTTTGACTACTGG
 GGCCAGGGCACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:66)

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

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCGCGT
 CACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTATCAGC
 AGAAGCCAGGCCAAAGCCCCAAAACCTCCTGATCTACTACACCTCACGCTTCCACTCA
 GGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTACCTTCACCAT
 TAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAACAGGAGCATACCC
 TTCCATATACCTTCGGTCAAGGCCACCAAGCTGGAGATCAAACGCCTGTGGCTGCA
 CCATCTGTCTTCATCTTTCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCGGAACCTGCCTCT
 GTTGTGTGCCCTGCTGAATAACTTCTATCCACCGGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGG
 TGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG
 CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTAC
 GAGAAACACMAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCTCCAG
 TCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGCTAA(SAQ ID NO:67)

Sequência de nucleótidos de domínio variável de cadeia
 leve 3E

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCGCGT
 CACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTATCAG
 CAGAAGCCAGGCCAAAGCCCCAAAACCTCCTGATCTACTACACCTCACGCTTCCACT
 CAGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTACCTTCACC
 ATTAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAACAGGAGCATA
 CCCTTCCATATACCTTCGGTCAAGGCCACCAAGCTGGAGATCAAACGC(SAQ ID
 NO:68)

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION

<120> MÉTODOS PARA TRATAR A DOR DA OSTEOARTRITE POR MEIO
 DA ADMINISTRAÇÃO DE UM ANTAGONISTA DE FATOR DE
 CRESCIMENTO DO NERVO E COMPOSIÇÕES CONTENDO O MESMO

<150> US 11/104,248

<151> 11-04-2006

<160> 77

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 2

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

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 3

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Phe | Ser | Leu | Ile | Gly | Tyr | Asp | Leu | Asn |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Ile | Trp | Gly | Asp | Gly | Thr | Thr | Asp | Tyr | Asn | Ser | Ala | Val | Lys | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

<210> 5

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 5

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu Asn
 1 5 10

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 7

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 8

Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 9

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ile Asn
 1 5 10

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 10

Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 11

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn His Leu Asn
 1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 13

Tyr Ile Ser Arg Phe His Ser
 1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 14

Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 15

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

<210> 16

<211> 447

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 16

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Glu | Ser | Gly | Pro | Gly | Leu | Val | Lys | Pro | Ser | Glu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Thr | Leu | Ser | Leu | Thr | Cys | Thr | Val | Ser | Gly | Phe | Ser | Leu | Ile | Gly | Tyr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Asp | Leu | Asn | Trp | Ile | Arg | Gln | Pro | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Ile | Ile | Trp | Gly | Asp | Gly | Thr | Thr | Asp | Tyr | Asn | Ser | Ala | Val | Lys |
| | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | | | |
| Ser | Arg | Val | Thr | Ile | Ser | Lys | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Gln | Phe | Ser | Leu |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Lys | Leu | Ser | Ser | Val | Thr | Ala | Ala | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Arg | Gly | Gly | Tyr | Trp | Tyr | Ala | Thr | Ser | Tyr | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val |
| 145 | | | | 150 | | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Pro | Ser | Ser | Asn | Phe | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Thr | Val | Glu | Arg | Lys | Cys | Cys |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Val | Glu | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Pro | Val | Ala | Gly | Pro | Ser | Val |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Phe | Arg | Val | Val | Ser |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| Val | Leu | Thr | Val | Val | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ser | Ser | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Ser | Lys | Thr | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Met | Leu | Asp | Ser |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | |

<210> 17

<211> 214

<212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Construção sintética
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 190
 <223> Xaa = Qualquer Aminoácido
 <400> 17

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

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu Asn
1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 19

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser
1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Asn His Leu Asn
1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 21

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser
1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Gln Leu Asn
1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 23

Tyr Val Ser Arg Phe His Ser
1 5

<210> 24

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 24

Arg Ala Phe Gln Ala Ile Ser Asn Gln Leu Asn
 1 5 10

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 25

Tyr Ile Ser Arg Phe His Thr
 1 5

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 26

Arg Ala Phe Gln Ser Ile Ser Asn Gln Leu Asn
 1 5 10

<210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 27

Tyr Ala Ser Arg Phe His Ser
 1 5

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 28

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ser Asn
 1 5 10

<210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 29

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu
 1 5 10

- <210> 30
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Sequência artificial

- <220>
- <223> Construção sintética

- <400> 30

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Leu Asn
 1 5 10

- <210> 31
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Sequência artificial

- <220>
- <223> Construção sintética

- <400> 31

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val
 1 5 10

- <210> 32
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Sequência artificial

- <220>
- <223> Construção sintética

<400> 32

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Thr
 1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 33

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val
 1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 34

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Thr
 1 5 10

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 35

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val
 1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 36

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ala Thr
 1 5 10

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 37

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val
 1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 38

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Ser
 1 5 10

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 39

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val
 1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 40

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ile Ser
 1 5 10

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 41

Gln Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val
 1 5 10

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 42

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ala Ser
 1 5 10

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 43

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val
 1 5 10

<210> 44

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 44

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ser Thr
 1 5 10

<210> 45
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 45

Ser Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu
 1 5 10

<210> 46
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 46

Gly Gly Tyr Trp Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 47
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 47

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 48

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 49
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 49

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Construção sintética
 <400> 50

Gln Gln Glu Lys Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Construção sintética
 <400> 51

Gln Gln Glu Ala Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 52
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Construção sintética

<400> 52

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 53

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 54

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 55

Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 56

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 57

Gln Gln Glu Ser Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 58

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ser Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 59

Gln Gln Glu Lys Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 60

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 61

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 62

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 62

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 63

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 64

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Construção sintética
 <400> 64

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 65
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Construção sintética
 <400> 65

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| caggtgcagc | tgcaggagtc | tggcccagga | ctggtgaagc | cttccgagac | cctgtccctc | 60 |
| acctgcactg | tctctgggtt | ctcacttata | ggctatgata | ttaactggat | ccgacagcct | 120 |
| ccaggaagg | gactggagtg | gattgggatt | atctggggtg | atggaaccac | agactataat | 180 |
| tcagctgtca | aatcccgcgt | caccatctca | aaagacacct | ccaagaacca | gttctccctg | 240 |
| aagctgagct | ctgtgaccgc | cgcgacacg | gccgtgtatt | actgtgcgag | aggaggttat | 300 |
| tggtacgcca | ctagctacta | ctttgactac | tggggccagg | gcaccctggt | caccgtctcc | 360 |
| tcagcctcca | ccaagggccc | atctgtcttc | ccactggccc | catgctcccg | cagcacctcc | 420 |
| gagagcacag | ccgcccctggg | ctgcctggtc | aaggactact | tcccagaacc | tgtgaccgtg | 480 |
| tcttggaaact | ctggcgctct | gaccagcggc | gtgcacacct | tcccagctgt | cctgcagctc | 540 |
| tcaggtctct | actcccctcag | cagcgtggtg | accgtgccat | ccagcaactt | cggcaccag | 600 |
| acctacacct | gcaacgtaga | tcacaagcca | agcaacacca | aggtcgacaa | gaccgtggag | 660 |
| agaaagtgtt | gtgtggagtg | tccaccttgt | ccagcccctc | cagtggccgg | accatccgtg | 720 |
| ttcctgttcc | ctccaaagcc | aaaggacacc | ctgatgatct | ccagaacccc | agaggtgacc | 780 |
| tgtgtgggtg | tggacgtgtc | ccacgaggac | ccagaggtgc | agttcaactg | gtatgtggac | 840 |
| ggagtggagg | tgcacaacgc | caagaccaag | ccaagagagg | agcagttcaa | ctccaccttc | 900 |
| agagtggtag | gcgtgctgac | cgtgggtgac | caggactggc | tgaacggaaa | ggagtataag | 960 |
| tgtaaggtgt | ccaacaagg | actgccatcc | agcatcgaga | agaccatctc | caagaccaag | 1020 |
| ggacagccaa | gagagccaca | gggtatatacc | ctgccaccat | ccagagagga | gatgaccaag | 1080 |
| aaccaggtgt | ccctgacctg | tctgggtgaag | ggattctatc | catccgacat | cgccgtggag | 1140 |
| tgggagtcca | acggacagcc | agagaacaac | tataagacca | ccccccaat | gctggactcc | 1200 |
| gacggatcct | tcttccctgta | ttccaagctg | accgtggaca | agtccagatg | gcagcagga | 1260 |
| aacgtgttct | cttgttccgt | gatgcacgag | gccctgcaca | accactatac | ccagaagagc | 1320 |
| ctgtccctgt | ctccaggaaa | gtaa | | | | 1344 |

<210> 66
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 66

```

cagggtgcagc tgcaggagtc tggcccagga ctggtgaagc cttccgagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtt ctcacttatc ggctatgat ttaactggat ccgacagcct 120
ccagggaaagg gactggagtg gattgggatt atctggggtg atggaaccac agactataat 180
tcagctgtca aatcccgcgt caccatctca aaagacacct ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggaggttat 300
tggtaagcca ctagctacta ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 363
tca

```

<210> 67
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 67

```

gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggtga ccgcgtcacc 60
atcacctgcc gcgcatctca gtccattagc aataatctga actggtatca gcagaagcca 120
ggcaaagccc caaaactcct gatctactac acctcacgct tccactcagg tgtcccatca 180
cgcttcagtg gcagtggctc tggtaagat ttcacctca ccattagcag cctgcaacca 240
gaagatattg ccacttatta ctgccaacag gagcataccc ttccatatac cttcgggtcaa 300
ggcaccaagc tggagatcaa acgcactgtg gctgcaccat ctgtcttcat ctttctcca 360
tctgatgagc agttgaaatc cggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
ccacgcgagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatccgg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacmaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagttctc cagtcacaaa gagcttcaac cgcggtgagt gctaa 645

```

<210> 68
 <211> 324
 <212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 68

```

gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggtga ccgcgtcacc 60
atcacctgcc gcgcatctca gtccattagc aataatctga actgggatca gcagaagcca 120
ggcaaagccc caaaactcct gatctactac acctcacgct tccactcagg tgtcccatca 180

cgcttcagtg gcagtggtc tggtagatg ttcaccttca ccattagcag cctgcaacca 240
gaagatattg ccacttatta ctgccaacag gagcataccc ttccatatac cttcgggtcaa 300
ggcaccaagc tggagatcaa acgc                                     324

```

<210> 69

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

```

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

```

<210> 70

<211> 120

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 70

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

<210> 71

<211> 120

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 71

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

<210> 72

<211> 120

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 72

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

<210> 73

<211> 95

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 73

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

<210> 74

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 74

```

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

```

<210> 75

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 75

```

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

```


<210> 76
 <211> 1429
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<400> 76

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| atggccaccg | actccagaac | ctcctggctg | ctgacagtgt | ccctgctgtg | tctgctgtgg | 60 |
| ccacaggagg | ccagcgctca | ggtgcagctg | caggagtctg | gcccaggact | ggtgaagcct | 120 |
| tccgagaccc | tgtccctcac | ctgcactgtc | tctgggttct | cacttatcgg | ctatgatcct | 180 |
| aactggatcc | gacagcctcc | agggaaagga | ctggagtgga | ttgggattat | ctgggggtgat | 240 |
| ggaaccacag | actataattc | agctgtcaaa | tcccgcgtca | ccatctcaaa | agacacctcc | 300 |
| aagaaccagt | tctccctgaa | gctgagctct | gtgaccgccg | cggacacggc | cgtgtattac | 360 |
| tgtgcgagag | gaggttattg | gtacgccact | agctactact | ttgactactg | gggccagggc | 420 |
| accctggfca | ccgtctcctc | agcctccacc | aagggeccat | ctgtcttccc | actggcccca | 480 |
| tgctcccgca | gcacctccga | gagcacagcc | gccctgggct | gcctgggtaa | ggactacttc | 540 |
| ccagaacctg | tgaccgtgtc | ctggaactct | ggcgtcttga | ccagcggcgt | gcacaccttc | 600 |
| ccagctgtcc | tgcagtcctc | aggtctctac | tccctcagca | gcgtggtgac | cgtgccatcc | 660 |
| agcaacttcg | gcacccagac | ctacacctgc | aacgtagatc | acaagccaag | caacaccaag | 720 |
| gtcgacaaga | ccgtggagag | aaagtgttgt | gtggagtgtc | caccttgtcc | agcccctcca | 780 |
| gtggccggac | catccgtgtt | cctgttccct | ccaaagccaa | aggacacctc | gatgatctcc | 840 |
| agaaccccag | aggtgacctg | tgtgggtggtg | gacgtgtccc | acgaggaccc | agaggtgcag | 900 |
| ttcaactggt | atgtggacgg | agtggagggtg | cacaacgcca | agaccaagcc | aagagaggag | 960 |
| cagttcaact | ccaccttcag | agtgggtgagc | gtgctgaccg | tggtgcacca | ggactggctg | 1020 |

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| aacggaaagg | agtataagtg | taaggtgtcc | aacaaggagc | tgccatccag | catcgagaag | 1080 |
| accatctcca | agaccaaggg | acagccaaga | gagccacagg | tgtataccct | gccaccatcc | 1140 |
| agagaggaga | tgaccaagaa | ccaggtgtcc | ctgacctgtc | tggtgaaggg | attctatcca | 1200 |
| tccgacatcg | ccgtggagtg | ggagtccaac | ggacagccag | agaacaacta | taagaccacc | 1260 |
| cctccaatgc | tggactccga | cggatccttc | ttcctgtatt | ccaagctgac | cgtggacaag | 1320 |
| tccagatggc | agcagggaaa | cgtgttctct | tgttccgtga | tgcacgaggc | cctgcacaac | 1380 |
| cactataccc | agaagagcct | gtccctgtct | ccaggaaagt | aattctaga | | 1429 |

<210> 77
 <211> 729
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Construção sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> 646

<223> m = A ou C

<400> 77

```

atggccaccg actccagaac ctctggctg ctgacagtgt ccttgctgtg tctgctgtgg 60
ccacaggagg ccagcgctga tatccagatg acacagtccc catcctccct gctgacctct 120
gtgggtgacc gcgtcaccat cacctgccgc gcatctcagt ccattagcaa taatctgaac 180
tggatcagc agaagccagg caaagcccca aaactcctga tctactacac ctcacgcttc 240
cactcaggtg tcccatcacg cttcagtggc agtggctctg gtacagattt caccttcacc 300
attagcagcc tgcaaccaga agatattgcc acttattact gccaacagga gcataccctt 360
ccatatacct tcggtcaagg caccaagctg gagatcaaac gcactgtggc tgcaccatct 420
gtcttcatct ttctccatc tgatgagcag ttgaaatccg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
ctgctgaata acttctatcc acgcgaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgccctc 540
caatccggtg actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccttgaccct gagcaaagca gactacgaga aacacmaagt ctacgcctgc 660
gaagtcacc atcagggcct gagttctcca gtcacaaaga gcttcaaccg cgggtgagtgc 720
taattctag
729

```

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 [0006]
- US 2004237124 A [0009]
- GB 9901441 W [0014] [0229] [0232] [0247]
- GB 9809951 A [0014] [0229] [0232] [0247]
- US 5545807 A [0090]
- US 5545806 A [0090]
- US 5569825 A [0090]
- US 5625126 A [0090]
- US 5633425 A [0090]
- US 5661016 A [0090]
- US 5750373 A [0090]
- US 5500362 A [0094] [0232]
- US 5821337 A [0094]
- US 6027927 A [0127]
- US 5807715 A [0142] [0246]
- US 4816567 A [0142] [0246]
- US 6331415 B [0142] [0246]
- WO 9404690 A [0148]
- US 4676980 A [0149]
- WO 9100360 A [0149]
- WO 92200373 A [0149]
- EP 03089 A [0149]
- WO 9958572 A [0151] [0168]
- US 5047335 A [0166]
- US 5510261 A [0166]
- US 5278299 A [0166]

- US 4683195 A [0192]
- US 4800159 A [0192]
- US 4754065 A [0192]
- US 4683202 A [0192]
- WO 8704462 A [0195] [0197] [0254]
- US 6436908 B [0216] [0257] [0268]
- US 6413942 B [0216] [0257] [0268]
- US 6376471 B [0216] [0257] [0268]
- WO 9007936 A [0218] [0259] [0270]
- WO 9403622 A [0218] [0259] [0270]
- WO 9325698 A [0218] [0259] [0270]
- WO 9325234 A [0218] [0259] [0270]
- WO 9311230 A [0218] [0259] [0270]
- WO 9310218 A [0218] [0259] [0270]
- WO 9102805 A [0218] [0259] [0270]
- US 5219740 A [0218] [0259] [0270]
- US 4777127 A [0218] [0259] [0270]
- GB 2200651 A [0218] [0259] [0270]
- EP 0345242 A [0218] [0259] [0270]
- WO 9412649 A [0218] [0259] [0270]
- WO 9303769 A [0218] [0259] [0270]
- WO 9319191 A [0218] [0259] [0270]
- WO 9428938 A [0218] [0259] [0270]
- WO 9511984 A [0218] [0259] [0270]
- WO 9500655 A [0218] [0259] [0270]
- US 5814482 A [0219] [0260] [0271]
- WO 9507994 A [0219] [0260] [0271]
- WO 9617072 A [0219] [0260] [0271]
- WO 9530763 A [0219] [0260] [0271]
- WO 9742338 A [0219] [0260] [0271]
- WO 9011092 A [0219] [0260] [0271]
- US 5580859 A [0219] [0260] [0271]
- US 5422120 A [0219] [0260] [0271]
- WO 9513796 A [0219] [0260] [0271]
- WO 9423697 A [0219] [0260] [0271]

- WO 9114445 A [0219] [0260] [0271]
- EP 0524968 A [0219] [0260] [0271]
- WO 2004026329 A [0229]
- WO 0178698 A [0231]
- WO 0164247 A [0231]
- US 5844092 A [0231]
- US 5877016 A [0231]
- US 6153189 A [0231] [0274]
- WO 2005019266 A [0231] [0232]
- US 5866692 A [0246] [0247]
- US 5530101 A [0246]
- US 5693761 A [0246]
- US 5693762 A [0246]
- US 5585089 A [0246]
- US 6180370 B [0246]
- EP 0519596 A [0247]
- US 6180377 B [0247]
- US 6054297 A [0247]
- US 5997867 A [0247]
- US 6210671 B [0247]
- US 6350861 B [0247]
- WO 0127160 A [0247]
- US 5565332 A [0249]
- US 5580717 A [0249]
- US 5733743 A [0249]
- US 6265150 B [0249]
- WO 9306213 A [0249]
- US 20010046959 A [0261] [0264] [0275]
- WO 0069829 A [0264]
- WO 9817278 A [0264]
- WO 0217914 A [0264]
- WO 0220479 A [0264]
- US 5342942 A [0264]
- US 6127401 A [0264]
- US 6359130 B [0264]

- US 6291247 B [0264] [0267]
- WO 9715593 A [0267]
- US 6017878 A [0267]
- WO 8909225 A [0267]
- WO 9806048 A [0267]
- WO 9721732 A [0275]
- WO 0073344 A [0275]
- WO 0215924 A [0275]
- US NO6306849 A [0277]
- WO 04065560 A [0279]
- US 5766863 A [0279]
- US 5891650 A [0279]
- WO 0053211 A [0290]
- US 5981568 A [0290]
- US 4485045 A [0302]
- US 4544545 A [0302]
- US 5013556 A [0302]
- US 3773919 A [0304]
- US 11104248 B [0442]
- US 20060411 B [0442]

Documentos de não patente citados na descrição

- **SMEYNE et al.** *Nature*, 1994, vol. 368, 246-249 [0002]
- **CROWLEY et al.** *Cell*, 1994, vol. 76, 1001-1011 [0002]
- **LINDSAY ; HARMER.** *Nature*, 1989, vol. 337, 362-364 [0002]
- **CHAO et al.** *Science*, 1986, vol. 232, 518-521 [0002]
- **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]
- **OTTEN et al.** *Eur J Pharmacol.*, 1984, vol. 106, 199-201 [0003]
- **OTTEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 10059-10063 [0003]

- **MATSUDA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 6508-6512 [0003]
- **PEARCE et al.** *J. Physiol.*, 1986, vol. 372, 379-393 [0003]
- **BISCHOFF et al.** *Blood*, 1992, vol. 79, 2662-2669 [0003]
- **HORIGOME et al.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 14881-14887 [0003]
- **TORCIA et al.** *Cell*, 1996, vol. 85 (3), 345-56 [0003]
- **LEON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 3739-3743 [0004]
- **TORCIA et al.** *Cell*, 1996, vol. 85, 345-356 [0004]
- **DI MARCO et al.** *J. Biol. Chem.*, vol. 268, 22838-22846 [0004]
- **UEYAMA et al.** *J. Hypertens*, 1993, vol. 11, 1061-1065 [0004]
- **LINDHOLM et al.** *Eur. J. Neurosci.*, 1990, vol. 2, 795-801 [0004]
- **KASSEL et al.** *Clin, Exp. Allergy*, 2001, vol. 31, 1432-40 [0004]
- **STEINER et al.** *Am. J. Physiol.*, 1991, vol. 261, F792-798 [0004]
- **SCHWARTZ et al.** *J Photochem. Photobiol.*, 2002, vol. B66, 195-200 [0004]
- **BRACCI-LAUDIERO et al.** *Neuroreport*, 1993, vol. 4, 563-565 [0005]
- **BRACCI-LAUDIERO et al.** *Neurosci. Lett.*, 1992, vol. 147, 9-12 [0005]
- **RAYCHAUDHURI et al.** *Acta Derm. l'enereol.*, 1998, vol. 78, 84-86 [0005]
- **FALCIM et al.** *Ann. Rheum. Dis.*, 1996, vol. 55, 745-748 [0005]
- **OKRAGLY et al.** *J. Urology*, 1999, vol. 161, 438-441 [0005]
- **BRAUN et al.** *Eur. J Immunol.*, 1998, vol. 28, 3240-3251 [0005]
- **ALOE et al.** *Arch. Rheum.*, 1992, vol. 35, 351-355 [0006]

- **ALOE et al.** *Clin. Exp. Rheumatol.*, 1992, vol. 10, 203-204 [0006]
- **ALOE.** *Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects*, 1993, vol. 15, 139-143 [0006]
- **ALOE et al.** *Rheumatol. Int.*, 1995, vol. 14, 249-252 [0006]
- **MANNI et al.** *Rheumatol. Int.*, 1998, vol. 18, 97-102 [0006]
- **IANNONE et al.** *Rheumatology*, 2002, vol. 41, 1413-1418 [0007]
- **HONGO et al.** *Hybridoma*, 2000, vol. 19 (3), 215-227 [0008] [0341] [0386]
- **RUBERTI et al.** *Cell. Molec. Neurobiol.*, 1993, vol. 13 (5), 559-568 [0008]
- *Eur. J. Immunol.*, 1999, vol. 29, 2613-2624 [0014] [0229] [0232] [0375] [0379]
- *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press, 1989 [0085]
- *Oligonucleotide Synthesis.* 1984 [0085]
- *Methods in Molecular Biology.* Humana Press [0085]
- *Cell Biology: A Laboratory Notebook.* Academic Press, 1998 [0085]
- *Animal Cell Culture.* 1987 [0085]
- **J.P. MATHER; P.E. ROBERTS.** *Introduction to Cell and Tissue Culture.* Plenum Press, 1998 [0085]
- *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures.* J. Wiley and Sons, 1993 [0085]
- *Methods in Enzymology.* Academic Press, Inc, [0085]
- *Handbook of Experimental Immunology* [0085]
- *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells.* 1987 [0085]
- *Current Protocols in Molecular Biology.* 1987 [0085]
- *PCR: The Polymerase Chain Reaction.* 1994 [0085]
- *Current Protocols in Immunology.* 1991 [0085]
- *Short Protocols in Molecular Biology.* Wiley and Sons, 1999 [0085]
- **C.A. JANEWAY; P. TRAVERS.** *Immunobiology*, 1997 [0085]
- **P. FINCH.** *Antibodies*, 1997 [0085]

- Antibodies: a practical approach. IRL Press, 1988 [0085]
- Monoclonal antibodies: a practical approach. Oxford University Press, 2000 [0085]
- E. HARLOW ; D. LANE. Using antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0085]
- The Antibodies. Harwood Academic Publishers, 1995 [0085]
- Cancer: Principles and Practice of Oncology. J.B. Lippincott Company, 1993 [0085]
- VAUGHAN et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol.14, 309-314 [0090]
- SHEETS et al. *PNAS, (USA)*, 1998, vol. 95, 6157-6162 [0090]
- HOOGENBOOM ; WINTER. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol.227, 381 [0090]
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0090]
- COLE et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, 1985, 77 [0090]
- BOERNER et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0090]
- CLYNES et al. *PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 652-656 [0094]
- RAVETCH ; KINET. *Ann. Rev. Immunol.*, 1991, vol.9, 457-92 [0095]
- CAPEL et al. *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0095]
- DE HAAS et al. *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 126, 330-41 [0095]
- GUYER et al. *J. Immunol.*, 1976, vol. 117, 587 [0095]
- KIM et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 249 [0095]
- GAZZANO-SANTORO et al. *J. Immunol. Methods*, 1996, vol. 202, 163 [0096]
- KABAT et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. National Institutes of Health, 1991 [0102]
- CHOTHIA et al. *Nature*, 1989, vol. 342, 877 [0102]
- AL-LAZIKANI et al. *J. Molec. Biol.*, 1997, vol. 273, 927-948 [0102]

- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, 1990 [0122]
- **REMINGTON.** The Science and Practice of Pharmacy. Mack Publishing, 2000 [0122] [0209] [0291] [0301] [0303]
- **PONS et al.** *Prot. Sci.*, 1999, vol. 8, 958-968 [0138]
- **PEETERS et al.** *Vaccine*, 2001, vol. 19, 2756 [0143] [0251]
- **LONBERG, N. ; D. HUSZAR.** *Int.Rev.Immunol*, 1995, vol. 13, 65 [0143] [0251]
- **POLLOCK et al.** *J Immunol Methods*, 1999, vol. 231, 147 [0143] [0251]
- **BIRD et al.** *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0144]
- **HOLLIGER, P. et al.** *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0145]
- **POLJAK, R. J. et al.** *Structure*, 1994, vol. 2, 1121-1123 [0145]
- **SURESH et al.** *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0146]
- **MILLSTEIN ; CUELLO.** *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0146]
- **CUNNINGHAM ; WELLS.** *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0155]
- **JEFFERIS ; LUND.** *Chem. Immunol.*, 1997, vol. 65, 111-128 [0162]
- **WRIGHT; MORRISON.** *TibTECH*, 1997, vol. 15, 26-32 [0162]
- **BOYD et al.** *Mol. Immunol.*, 1996, vol. 32, 1311-1318 [0162]
- **WITTWE ; HOWARD.** *Biochem.*, 1990, vol. 29, 4175-4180 [0162]
- **WYSS ; WAGNER.** *Current Opin. Biotech.*, 1996, vol. 7, 409-416 [0162]
- **UMANA et al.** *Mature Biotech.*, 1999, vol. 17, 176-180 [0162]
- **HSE et al.** *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 9062-9070 [0165]
- 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 [0184]

- Unified Approach to Alignment and Phylogenesis. **HEIN J.** Methods in Enzymology. Academic Press, Inc, 1990, vol. 183, 626-645 [0184]
- **HIGGINS, D.G. ; SHARP, P.M.** *CABIOS*, 1989, vol.5, 151-153 [0184]
- **MYERS, E.W. ; MULLER W.** *CABIOS*, 1988, vol. 4, 11-17 [0184]
- **ROBINSON, E.D.** *Comb. Theor.*, 1971, vol. 11, 105 [0184]
- **SANTOU, N. ; NES, M.** *Mol. Biol. Evol.*, 1987, vol. 4, 406-425 [0184]
- **SNEATH, P.H.A. ; SOKAL, R.R.** Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy. Freeman Press, 1973 [0184]
- **WILBUR, W.J. ; LIPMAN, D.J.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 726-730 [0184]
- PCR: The Polymerase Chain Reaction. Birkauser Press, 1994 [0192]
- **ZOLA.** Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. CRC Press, Inc, 1987, 147-158 [0204]
- **MAHATO et al.** *Pharm. Res.*, 1997, vol. 14, 853-859 [0214]
- **FINDEIS et al.** *Trends Biotechnol.*, 1993, vol. 11, 202 [0217]
- **CHIOU et al.** Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer. 1994 [0217] [0258] [0269]
- **WU et al.** *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 621 [0217] [0258] [0269]
- **WU et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 542 [0217] [0258] [0269]
- **ZENKE et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1990, vol. 87, 3655 [0217]
- **WU et al.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 338 [0217] [0258] [0269]

- **JOLLY.** *Cancer Gene Therapy*, 1994, vol. 1, 51 [0217] [0258] [0269]
- **KIMURA.** *Human Gene Therapy*, 1994, vol. 5, 845 [0217] [0258]
- **CONNELLY.** *Human Gene Therapy*, 1995, vol. 1, 185 [0217] [0258] [0269]
- **KAPLITT.** *Nature Genetics*, 1994, vol. 6, 148 [0217] [0258] [0269]
- **CURIEL.** *Hum. Gene Ther.*, 1992, vol. 3, 147 [0219] [0259] [0260] [0270] [0271]
- **WU.** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 16985 [0219] [0260] [0271]
- **PHILIP.** *Mol. Cell Biol.*, 1994, vol. 14, 2411 [0219] [0260] [0271]
- **WOFFENDIN.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, vol. 91, 1581 [0219] [0260] [0271]
- **KATZ et al.** *Surg Clin North Am.*, 1999, vol. 79 (2), 231-52 [0224]
- **CARACENI et al.** *J Pain Symptom Manage*, 2002, vol. 23 (3), 239-55 [0224]
- **HONGO et al.** *Hybridoma*, 2000, vol. 19, 215-227 [0231] [0232] [0238] [0256] [0283]
- *Cell. Molec. Biol.*, 1993, vol. 13, 559-568 [0231]
- **KARLSSON, R. ; ROOS, H. ; FAGERSTAM, L. ; PETERSSON, B.** *Methods Enzymology*, 1994, vol. 6, 99-110 [0236] [0340]
- **KOHLER, B. ; MILSTEIN, C.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0242]
- **BUCK, D. W. et al.** *In Vitro*, 1982, vol. 18, 377-381 [0242]
- **WINTER et al.** *Nature*, 1991, vol. 349, 293-299 [0247]
- **LOBUGLIO et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 4220-4224 [0247]
- **SHAW et al.** *J Immunol.*, 1987, vol. 138, 4534-4538 [0247]
- **BROWN et al.** *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, 3577-3583 [0247]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0247]
- **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0247]

- **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0247]
- **DAUGHERTY et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1991, vol. 19, 2471-2476 [0247]
- **WINTER et al.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1994, vol. 12, 433-455 [0249]
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-553 [0249]
- **JOHNSON, KEVIN S. ; CHISWELL, DAVID J.** *Current Opinion in Structural Biology*, 1993, vol. 3, 564-571 [0249]
- **CLACKSON et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0249]
- **MARK et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0249]
- **GRIFFITH et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0249]
- **MARKS et al.** *Bio/Technol.*, 1992, vol. 10, 779-783 [0249]
- **WATERHOUSE et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0249]
- **MORRISON et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1984, vol. 81, 6851 [0254]
- **HARLOW ; LANE.** *Using Antibodies, a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0255]
- **FINDEIS et al.** *Trends Biotechnol.*, 1993, vol. 11, 202 [0258] [0269]
- **ZENKE et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 3655 [0258] [0269]
- **BORSANI et al.** *Nuc. Acids Res.*, 1990, vol. 18, 4020 [0261]
- **ULLRICH et al.** *Nature*, 1983, vol. 303, 821-825 [0261]
- **WOOLF et al.** *J. Neurosci.*, 2001, vol. 21 (3), 1047-55 [0262]
- **TAGLIALETELA et al.** *J Neurochem*, 1996, vol. 66(5), 1826-35 [0262]
- **COLQUHOUN et al.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004, vol. 310 (2), 505-11 [0264]
- **LI et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 10884 [0268]
- **EIDE et al.** *J. Neurosci.*, 1996, vol. 16, 3123 [0268]
- **LIU et al.** *J. Neurosci.*, 1997, vol. 17, 8749 [0268]
- **KLEIN et al.** *Cell*, 1990, vol. 61, 647 [0268]

- VALENZUELA et al. *Neuron*, 1993, vol. 10, 963 [0268]
- TSOULFAS et al. *Neuron*, 1993, vol. 10, 975 [0268]
- LAMBALLE et al. *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 3083 [0268]
- KIMURA. *Human Gene Therapy*, 1994, vol. 5 (845) [0269]
- KNUSEL et al. *J. Neurochem.*, 1992, vol. 59, 715-722 [0277]
- KNUSEL et al. *J. Neurochemistry*, 1991, vol. 57, 955-962 [0277]
- KOIZUMI et al. *J. Neuroscience*, 1988, vol. 8, 715-721 [0277]
- GREENE et al. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1976, vol. 73 (7), 2424-8 [0282]
- LEVI-MONTALCINI, R. ; ANGELETTI, P. Nervegrowth factor. *Physiol. Rev.*, 1968, vol. 48, 534-569 [0282]
- CHUN ; PATTERSON. *Dev. Biol.*, 1977, vol. 75, 705-711 [0282]
- BUCHMAN ; DAVIES. *Development*, 1993, vol. 118, 989-1001 [0282]
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Lippincott Williams and Wilkins, 2000 [0286]
- EPSTEIN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0302]
- HWANG et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0302]
- BALINT et al. *Gene*, 1993, vol. 137 (1), 109-18 [0319] [0334] [0342]
- KAY et al. Phage display of peptides and proteins : a laboratory manual. Academic Press, 1996, 277-291 [0334]
- INNIS et al. *PCR protocols: A guide to methods and applications*, 1990, 177-183 [0334]
- PRODRMOU et al. *Protein Eng*, 1992, vol. 5 (8), 827-9 [0342]
- BARBAS. Phage display: a laboratory manual. ColdSpring Harbor Laboratory Press, 2001, 2.10 [0342]
- INNIS et al. PCR strategies. Academic Press, 1995 [0342]

- **AL-LAZIKANI et al.** *J. Mol. Biol.*, 1997, vol. 273 (4), 927-48 [0342]
- **KAY et al.** Phage display of peptides and proteins :a laboratory manual. Academic Press, 1996 [0342]
- **KAY et al.** Phage display of Peptides and Proteins:a laboratory manual. Academic Press, 1996 [0344]
- **BRENNAN et al.** *Pain*, 1996, vol. 64, 493-501 [0381]
- **KUZUNA et al.** *Chem. Pharm. Bull*, 1975, vol. 23, 1184-1191 [0388]
- **PEARSON et al.** *Arthritis Rheum.*, 1959, vol. 2, 440-459 [0388]
- **BELLAMY et al.** *J. Rheumatol*, 1988, vol. 15, 1833-40 [0431]
- **BELLAMY.** *Semin. Arthritis Rheum.*, 1989, vol. 18, 14-7 [0431]

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF no fabrico de um medicamento para melhorar a função física num indivíduo tendo osteoartrite.
2. Utilização de uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF no fabrico de um medicamento para tratar a dor, melhorar a função física e melhorar a rigidez num indivíduo com osteoartrite.
3. A utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o indivíduo é um ser humano.
4. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o anticorpo anti-NGF é preparado para ser administrado a uma frequência de dosagem num intervalo desde uma vez cada semana até uma vez cada doze semanas.
5. A utilização de acordo com a reivindicação 4, em que o anticorpo anti-NGF é preparado para ser administrado a uma frequência de dosagem de uma vez cada oito semanas.
6. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-NGF é preparado para ser administrado a uma dose num intervalo desde 3 mg/kg até 1 mg/kg.
7. A utilização de acordo com a reivindicação 6, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é preparado para ser administrado a uma dose de 100 mg/kg ou de 300 mg/kg.

8. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-NGF é administrado por via intravenosa ou subcutânea.

9. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-NGF liga a NGF humano.

10. A utilização de acordo com a reivindicação 9, em que o anticorpo anti-NGF liga adicionalmente a NGF de roedor.

11. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-NGF bloqueia a interação de NGF humano com trkA e/ou p75.

12. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-NGF compete para ligação a NGF humano com um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácido de SEQ ID NO: 1 e 2.

13. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-NGF liga essencialmente ao mesmo epítipo de NGF humano que um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácido de SEQ ID NO: 1 e 2.

14. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-NGF liga a um epítipo de NGF humano compreendendo um ou mais de: resíduos K32, K34 and E35 de NGF humano; resíduos Y79 e T81 de NGF humano; resíduos H84 e K88; resíduo R103 de NGF humano; resíduo E11 de NGF humano; Y52 de NGF humano; resíduos L112 e S113 de NGF humano; resíduos R59 e R69 de NGF humano; ou resíduos V 18, V20, e G23 de NGF humano.

15. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-NGF:

(a) liga a NGF com uma K_D de menos de 2 nM;

(b) inibe a sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios de ratinho trigeminais E13.5 com uma CI50 de 100 pM ou menos,

em que a CI50 é medida na presença de NGF humano a 15 pM;
e

(c) inibe a sobrevivência dependente de NGF humano de neurónios de ratinho trigeminais E13.5 com uma CI50 de 10 pM ou menos,

em que a CI50 é medida na presença de NGF a 1,5 pM.

16. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-NGF compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO:4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO:5; e

uma região variável de cadeia leve compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO:6;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO:7; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO:8.

17. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-NGF é um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOS: 1 e 2.

18. A utilização de acordo com a reivindicação 17, em que o anticorpo anti-NGF é um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NOS: 16 e 17.

19. Um *kit* compreendendo uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF e instruções para administrar uma quantidade eficaz do anticorpo antagonista anti-NGF a um indivíduo tendo osteoartrite para utilização na melhoria da função física no indivíduo.

20. Um *kit* compreendendo uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF e instruções para administrar uma quantidade eficaz do anticorpo antagonista anti-NGF a um indivíduo tendo osteoartrite para utilização no tratamento da dor, melhoria da função física e melhoria da rigidez no indivíduo.

21. Uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo antagonista anti-NGF e um portador farmacêuticamente aceitável para utilização na melhoria da função física num indivíduo tendo osteoartrite.

22. Uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo antagonista anti-NGF e um portador farmacêuticamente aceitável para utilização no tratamento da dor, melhoria da função física e melhoria da rigidez num indivíduo tendo osteoartrite.

23. Um anticorpo antagonista anti-NGF para utilização na melhoria da função física num indivíduo tendo osteoartrite.

24. Um anticorpo antagonista anti-NGF para utilização no tratamento da dor, melhoria da função física e melhoria da rigidez num indivíduo tendo osteoartrite.

Fig. 1A

CDRs: **negrito e itálico** = Kabat; sublinhado = Chothia

1A) REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA

- 1 = anticorpo 911 de ratinho (CDRs)
- 2 = VH4 - linha germinal acetivadora humana 59
- 3 = CDR enxertada
- 4 = 3 + uma mutação estrutural
- 5 = 4 + maturação de afinidade H1, H2
- 6 = 5 + maturação de afinidade H3 (região variável de cadeia pesada de anticorpo 3E)

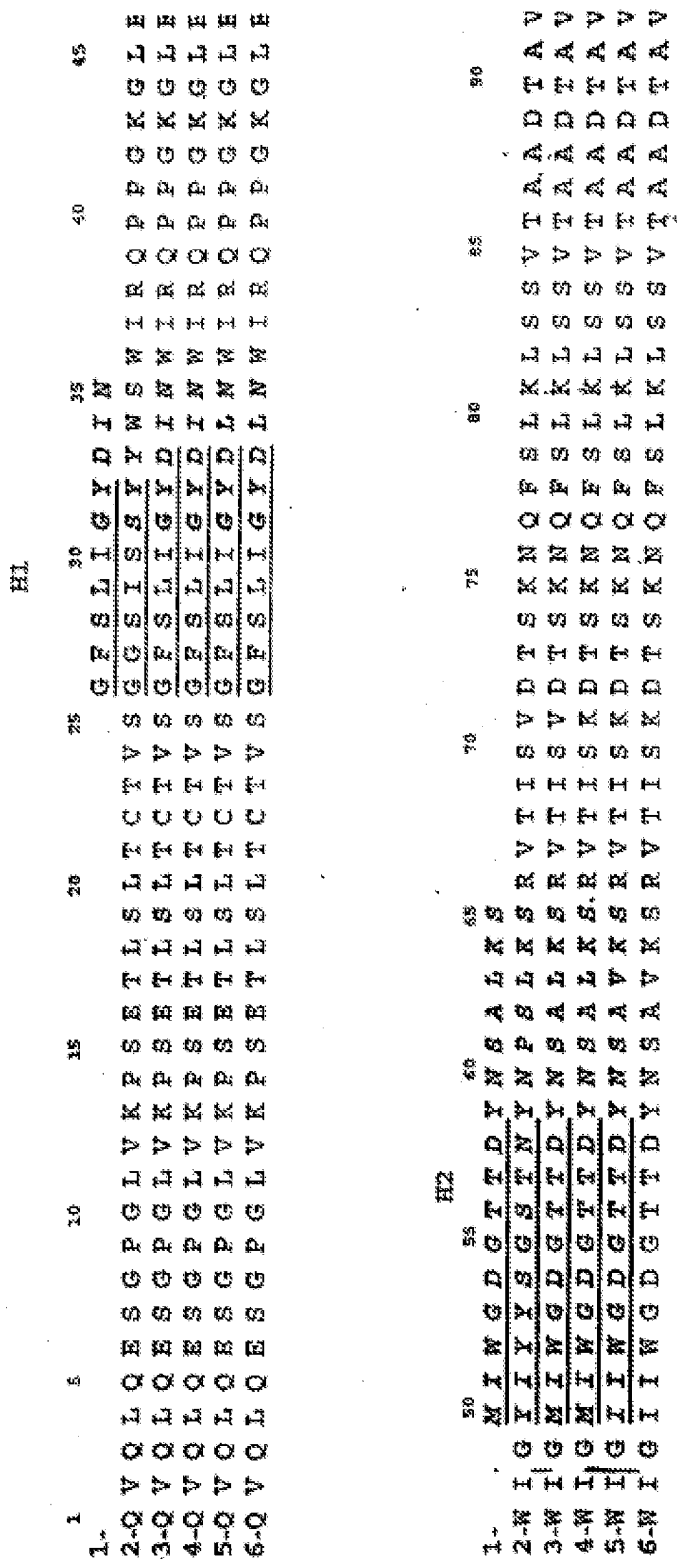


Fig. 1A (continuação)

| | | | | | | |
|-----|----|-------------|-------------|-------------|-----|-----|
| | 95 | 100 | 105 | 110 | 115 | 120 |
| | | <u>GGYY</u> | <u>YGTS</u> | <u>YFDY</u> | | |
| 1- | C | A | R | G | | |
| 2-Y | Y | C | A | R | G | Q |
| 3-Y | Y | C | A | R | G | Q |
| 4-Y | Y | C | A | R | G | Q |
| 5-Y | Y | C | A | R | G | Q |
| 6-Y | Y | C | A | R | G | Q |

Fig. 1B

1B) REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA LEVE

- 1 = anticorpo 911 de ratinho (CDRs)
- 2 = linha germinal acetadora humana 08
- 3 = CDR enxertada
- 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 | | | | | | | | | | | |
| 1- | I | Q | M | T | Q | S | P | S | S | L | S | A | S | Q | D | I | S | N | H | L | N |
| 2-D | I | Q | M | T | Q | S | P | S | S | L | S | A | S | Q | D | I | S | N | H | L | N |
| 3-D | I | Q | M | T | Q | S | P | S | S | L | S | A | S | Q | D | I | S | N | H | L | N |
| 4-D | I | Q | M | T | Q | S | P | S | S | L | S | A | S | Q | D | I | S | N | H | L | N |
| 5-D | I | Q | M | T | Q | S | P | S | S | L | S | A | S | Q | D | I | S | N | H | L | N |

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

Fig. 1B (continuação)

| | | | | |
|-----|-----|--|--|--|
| 1-T | 96 | | | |
| L | | | | |
| B | | | | |
| X | | | | |
| Y | | | | |
| T | | | | |
| 2-W | 100 | | | |
| L | | | | |
| D | | | | |
| 3-T | | | | |
| L | | | | |
| P | | | | |
| Y | | | | |
| T | | | | |
| F | | | | |
| Q | | | | |
| Q | | | | |
| G | | | | |
| T | | | | |
| K | | | | |
| L | | | | |
| E | | | | |
| I | | | | |
| K | | | | |
| R | | | | |
| T | | | | |
| 4-T | | | | |
| L | | | | |
| P | | | | |
| I | | | | |
| T | | | | |
| F | | | | |
| Q | | | | |
| Q | | | | |
| G | | | | |
| T | | | | |
| K | | | | |
| L | | | | |
| E | | | | |
| I | | | | |
| K | | | | |
| R | | | | |
| T | | | | |
| 5-T | | | | |
| L | | | | |
| P | | | | |
| I | | | | |
| T | | | | |
| F | | | | |
| Q | | | | |
| Q | | | | |
| G | | | | |
| T | | | | |
| K | | | | |
| L | | | | |
| E | | | | |
| I | | | | |
| K | | | | |
| R | | | | |
| T | | | | |

Fig. 2

Db.9.11.3E padrão; ADN circular; ; 1429 PB.

Esse arquivo é criado por Vector NTI

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

VNUPDATE|265871584|

VNDEDATE|285873257|

VNAUTHORNAME|Demo User|

Sequence 1429 BP; 331 A; 440 C; 380 G; 278 T;

```

atggccnccg actccagaa ctcctggctg ctgacagtgt cccctgctgtg totgctgtgg
ccacaggagg ccaggctoa ggtgcagctg caggagtctg gccccaggact ggtgagacct
tcagagacc tytccctac ctgcactgtc tctgggtctt cacttatctg ctatgatctt
aacctggatc gacagcctc agggaaggga ctggagtga ttgggattat ctgyygtgat
ggaaaccag actatantc agctgcaaa tcccggctca ccatctcaaa agacacctcc
aagaaaccag tctccctgaa gctgagctct gtagccggc eggacccggc cgtgtattac
tgtgogagag gaggctatg gtaagcact agctactact ttgactactg gggccagggg
acctggtba ccgtctctc agcctccacc aaggcccat ctgtctctcc actygcacca
tgtctccgca gccctccga ggcacagcc gccctgggt gccctggctaa ggaactactc
ccagaaacct tyaccctgct ctggaactct ggcgctctga ccaggcggct gcaaccttc
ccagctgtcc tgcagctctc aggtctctac tccctcagca gcctgggtgac cgtgacctcc
agcaactctg gcccccagc ctacacctgc aacctagatc acaagcccaag caaacccaag
gtcgacaaga ccctggagag aaagtgttgt gtggagtgtc caccttgtcc agccctccca
gtggccggac cctccgtgtt cctgtctcct ccnaagccaa aggacacct gatgatctcc
agaaccccag agtggacctg tgtgggtgtg gacctgtccc agaggacc cc agaggtgcaag
ttcaactcct atgtggacgg agtggaggtg cacaacgcca agacaaagcc agagagggag
cagttcaact ccaccttca agtgggtgag gtctgacctg aacaaggcc tggctgacctg
aacggaaagg agtataagt taagggtccc aacaaaggcc agccacag catogagaag
acctctcca ayaccaaagg ccaggtgtcc ctgacctgtc tggtaacct gccacctcc
agagaggaga tgcacaagaa ccaggtgtcc gtagacctg tggtaagggt attctatcca
tcggacctcg ccgtgyagt ggagctcaac gtagacctg gtagacctg taagaccaac
cctccaatgc tggactccga cggatccttc tctctgtatt ccaagctgac cgtggacaag
tcagatggc agcagggaaa cgtgtctct tctctctct tgcacagggg cctgcaacaac
cactataccc agaagagcct gtccctctct ccaggaaagt aattctaga

```

60

120

180

240

300

360

420

480

540

600

660

720

780

840

900

960

1020

1080

1140

1200

1260

1320

1380

1420

Fig. 3

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

Este arquivo é criado por Vektor NTI

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

VNTRDATE | 285871514 |

VNTRDBDATE | 285872959 |

VNTRAUTHORNAME | Demo User |

Sequence 729 BP; 182 A; 231 C; 161 G; 154 T; 1 other;

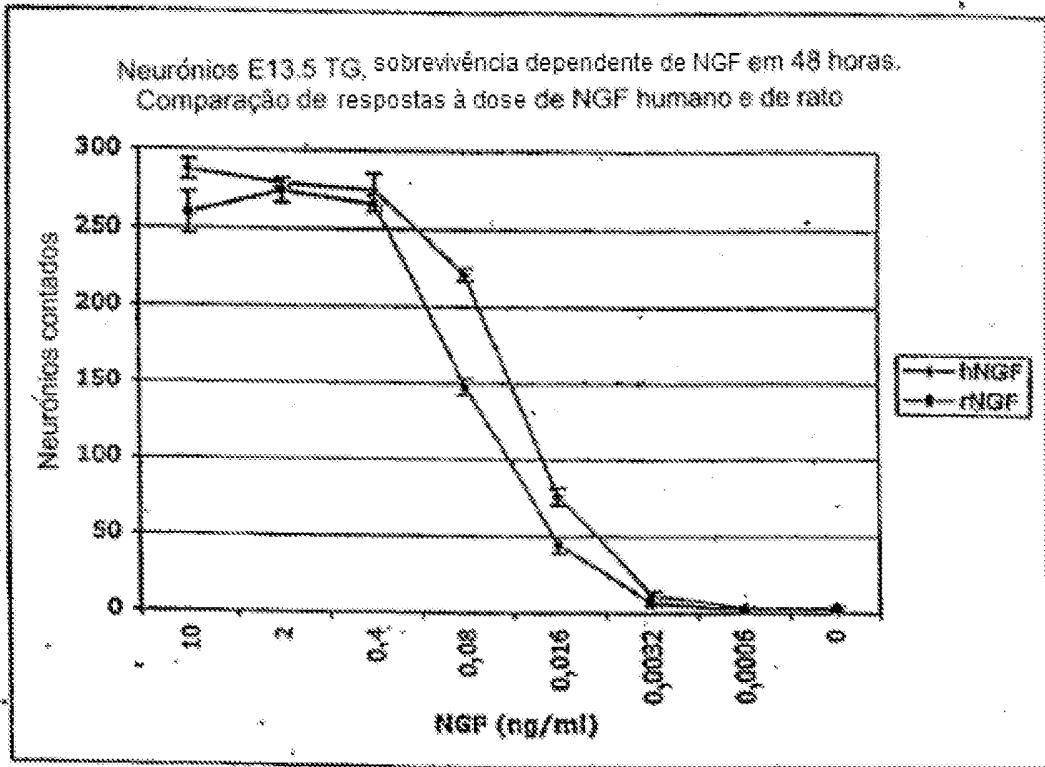
```

atgycacacg actccagaac ctccctggctg ctgacagtg cccctgctgtg tctgctgtgg
ccaacggagg ccagcgotga tatccagatg acacagtcoc cctcctccct gtctgcoctct
gtggytgacc gcgtaccat cacctgcgcg gcactctcagt ccattagcaa taatctgaac
tgytatcagc agagccagg caaagcccca aaactcctga tctactaac ctcacgcttc
cactcaggtg tcccatcag ctccagtgcc agtggctctg gtaacagattt caccttcacc
attagcagcc tgcascaga agatattggc acttattact gccaacaggga gcataccctt
ccatatacct tcggtcaagg cacdaagctg gayatcaaac gcaotgtggc tggacccatct
gtcttccctct tccctccatc tgatgagcag ttgaaatccg gaactgcctc tggctgtgtgc
ctgctgaata acttctatcc acgcgagggc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcoctc
caatccggta actcccagga gagtgtcaca ggcagggaca gaaaggacag cacctacagc
ctcagcagca cctgacctt gagcaaaaga gactacgaga aacacmaagt ctacgcoctgc
gaagtaccc atcagggcct gagttctcca gtcaacaaga gottcaaacg cgggtgagtg
taattctag

```

60
120
180
240
300
360
420
480
540
600
660
720
729

Fig. 4



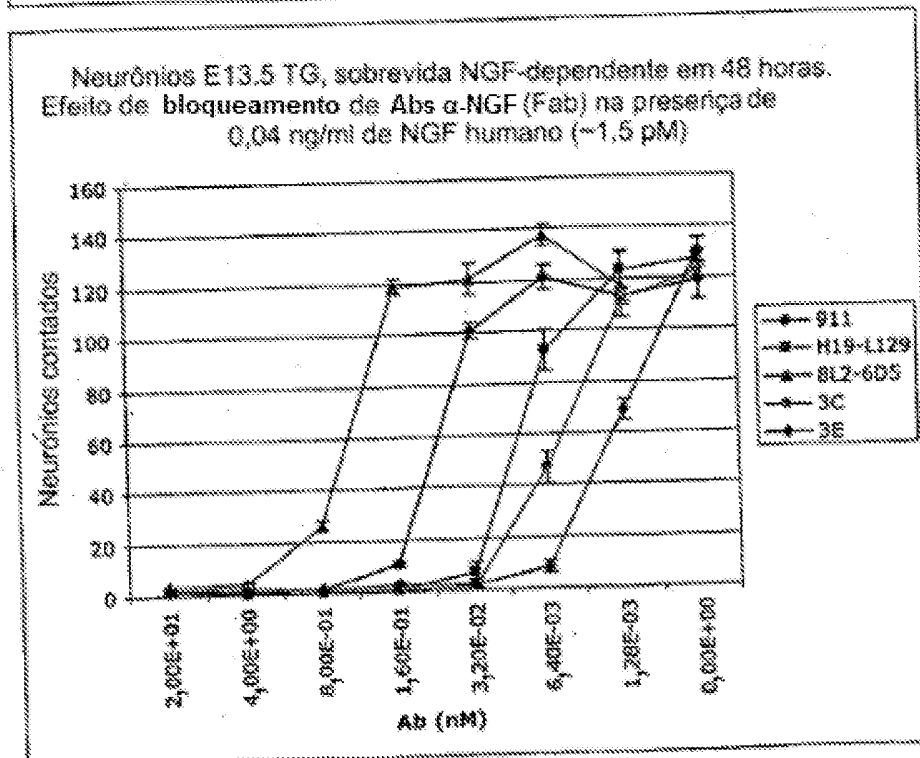
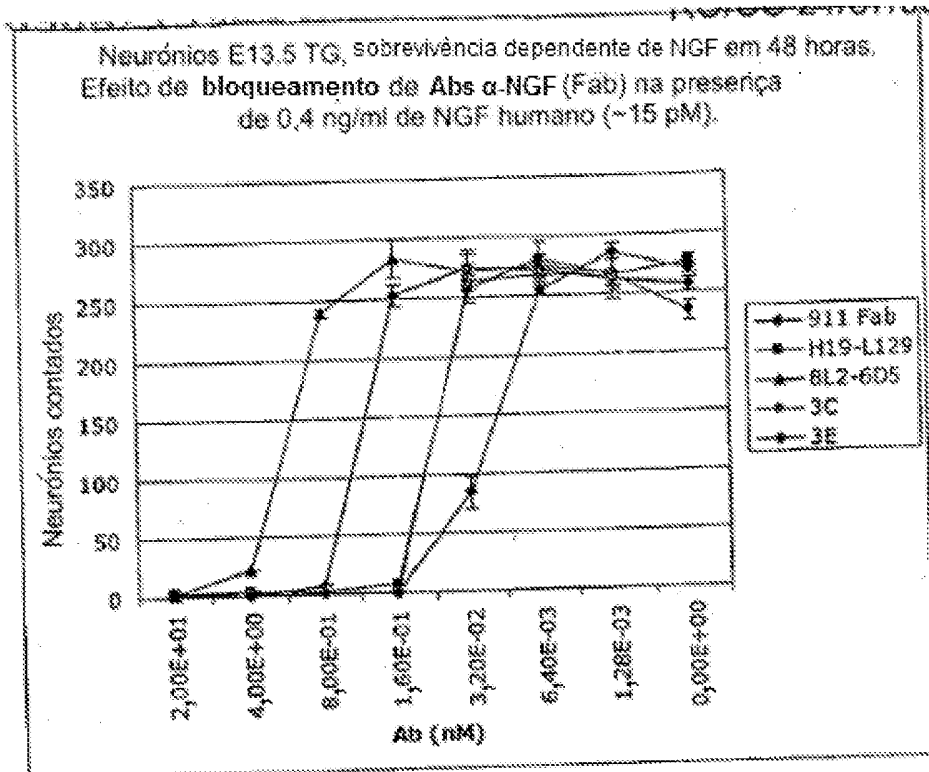


Fig. 5

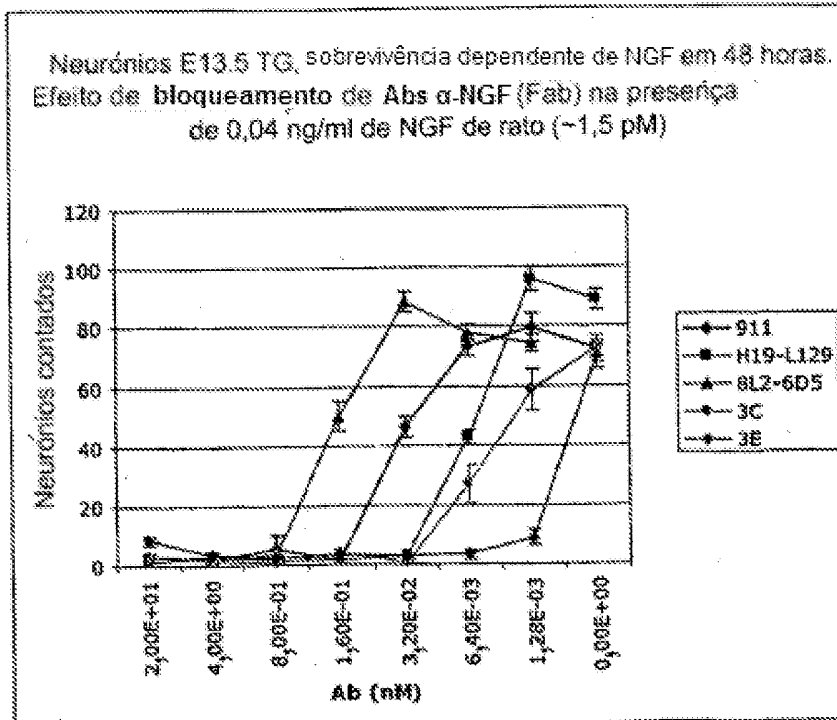
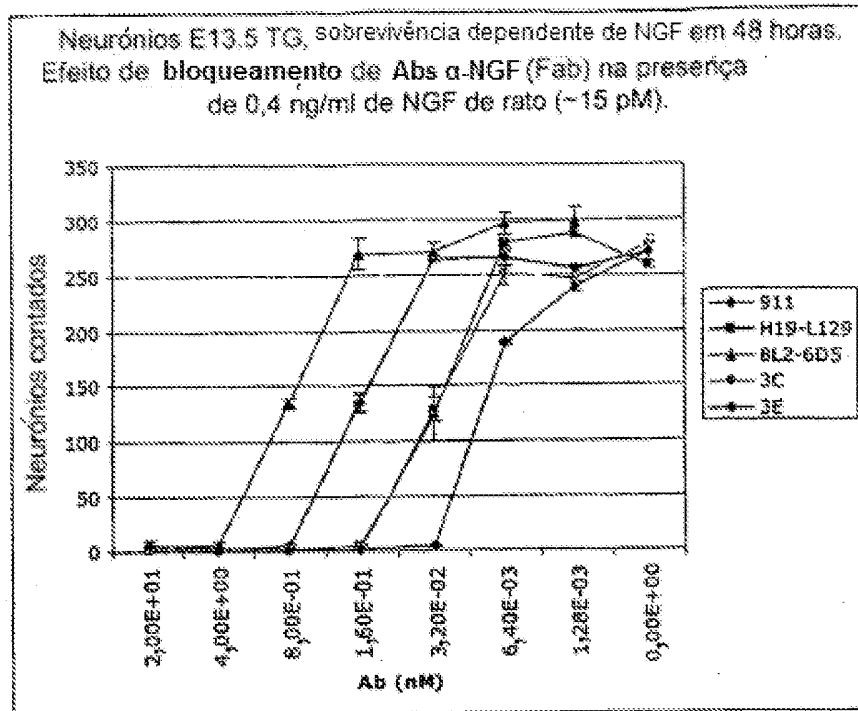


Fig. 6

Anticorpo anti-NGF E3 humanizado
melhoria dor pós-cirúrgica

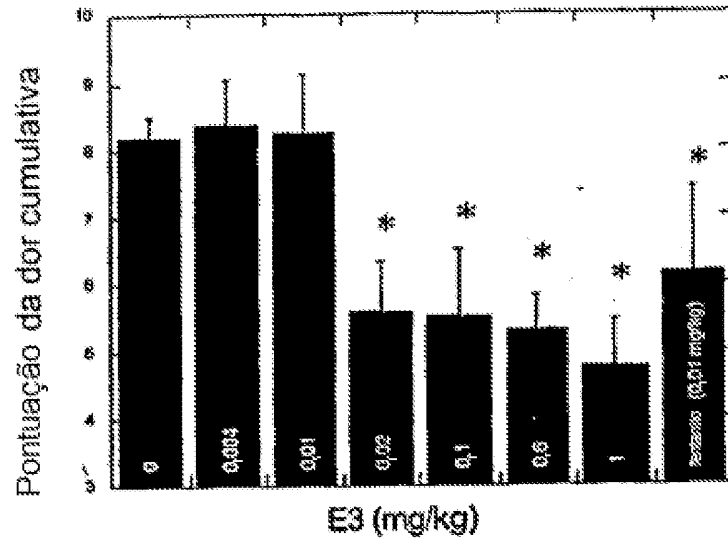


Fig. 7

Anticorpo anti-NGF E3 alivia a dor quando injetado duas horas depois da cirurgia

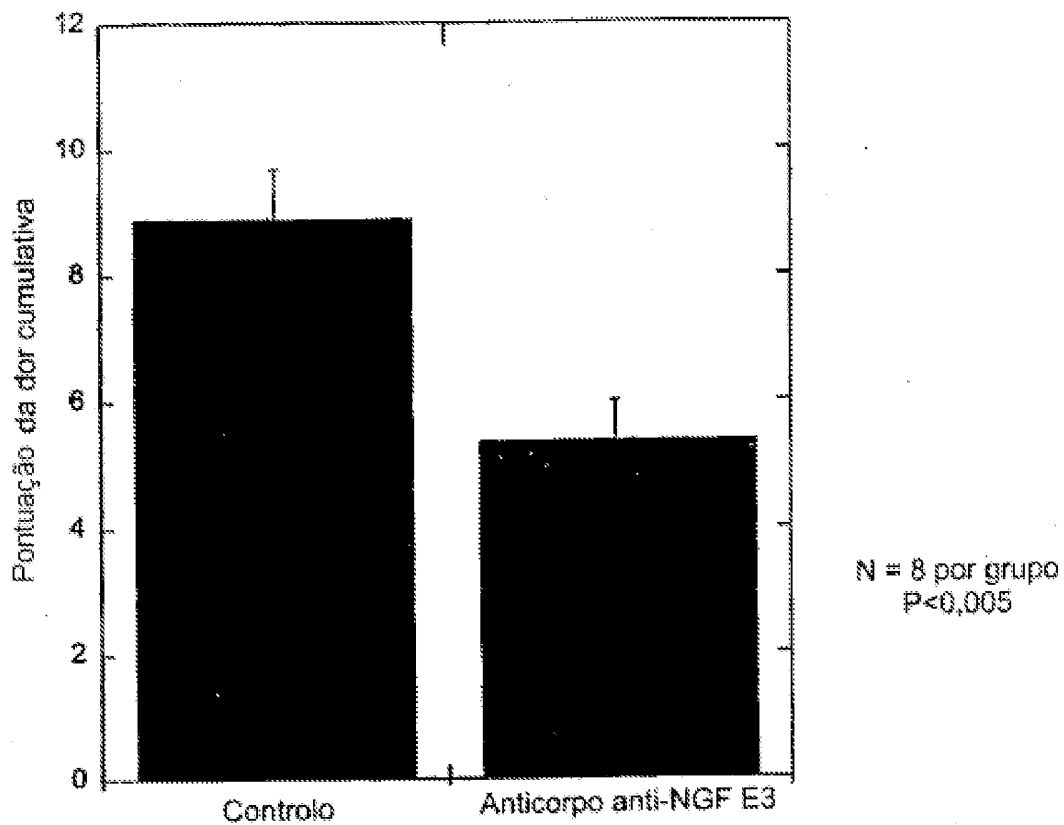


Fig. 8

Cinética de ligação: Fab 911 sobre chip N3F CM5

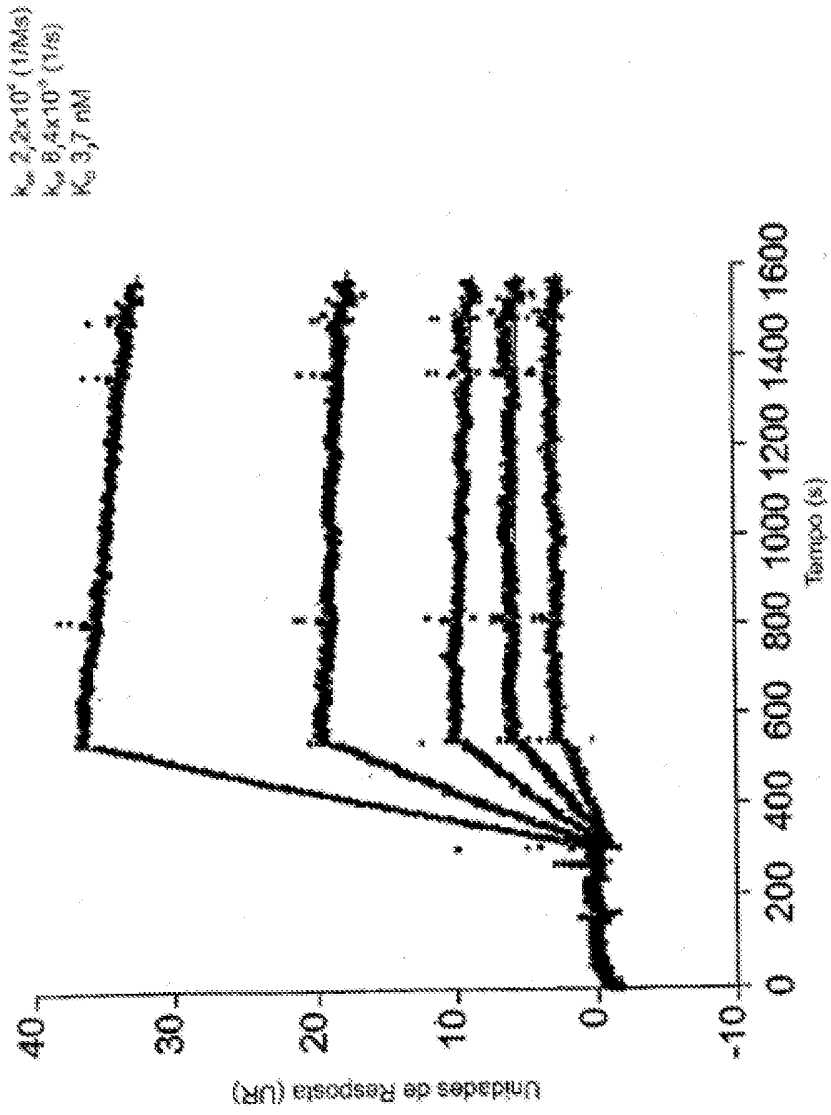


Fig. 9

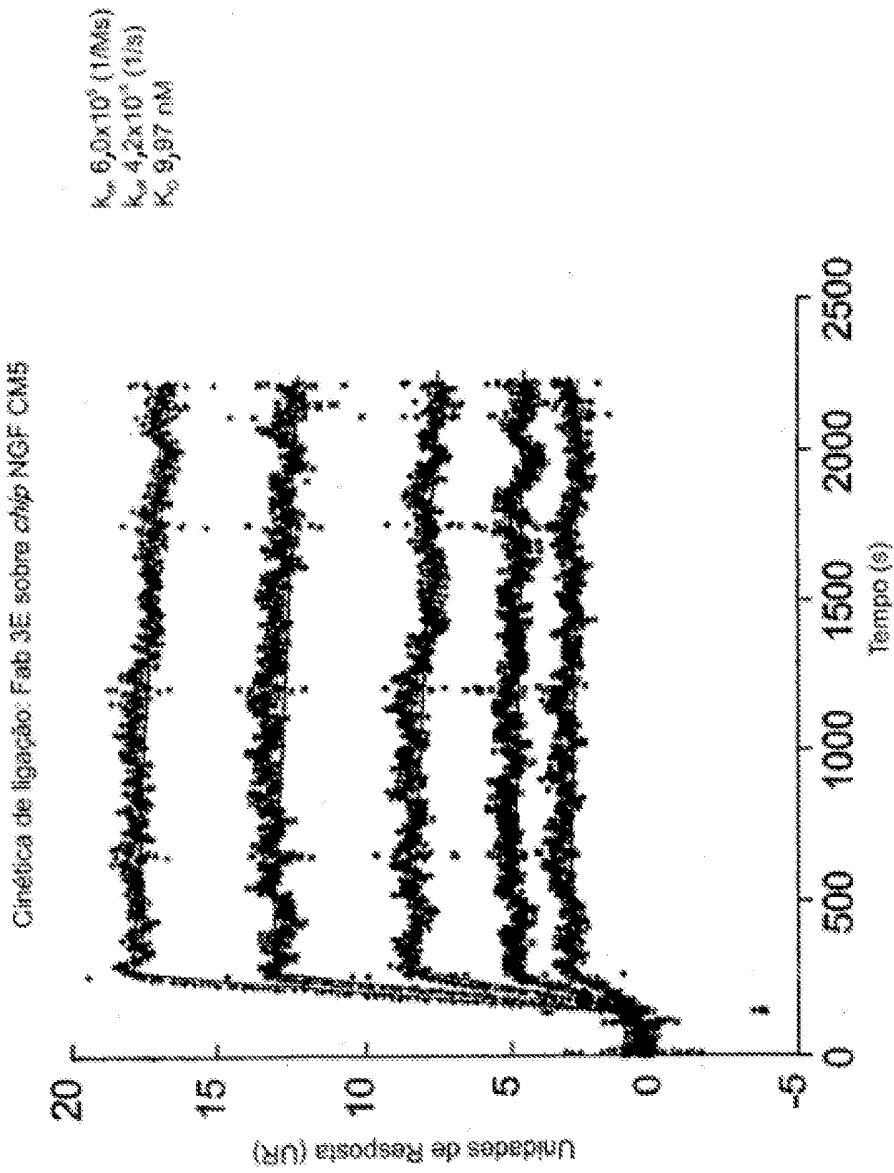
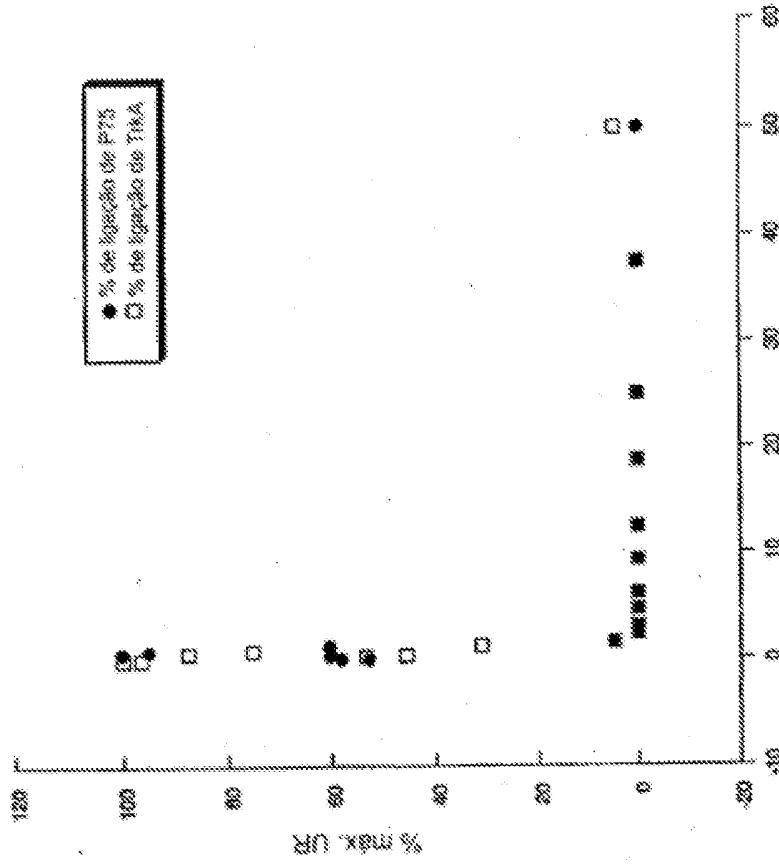


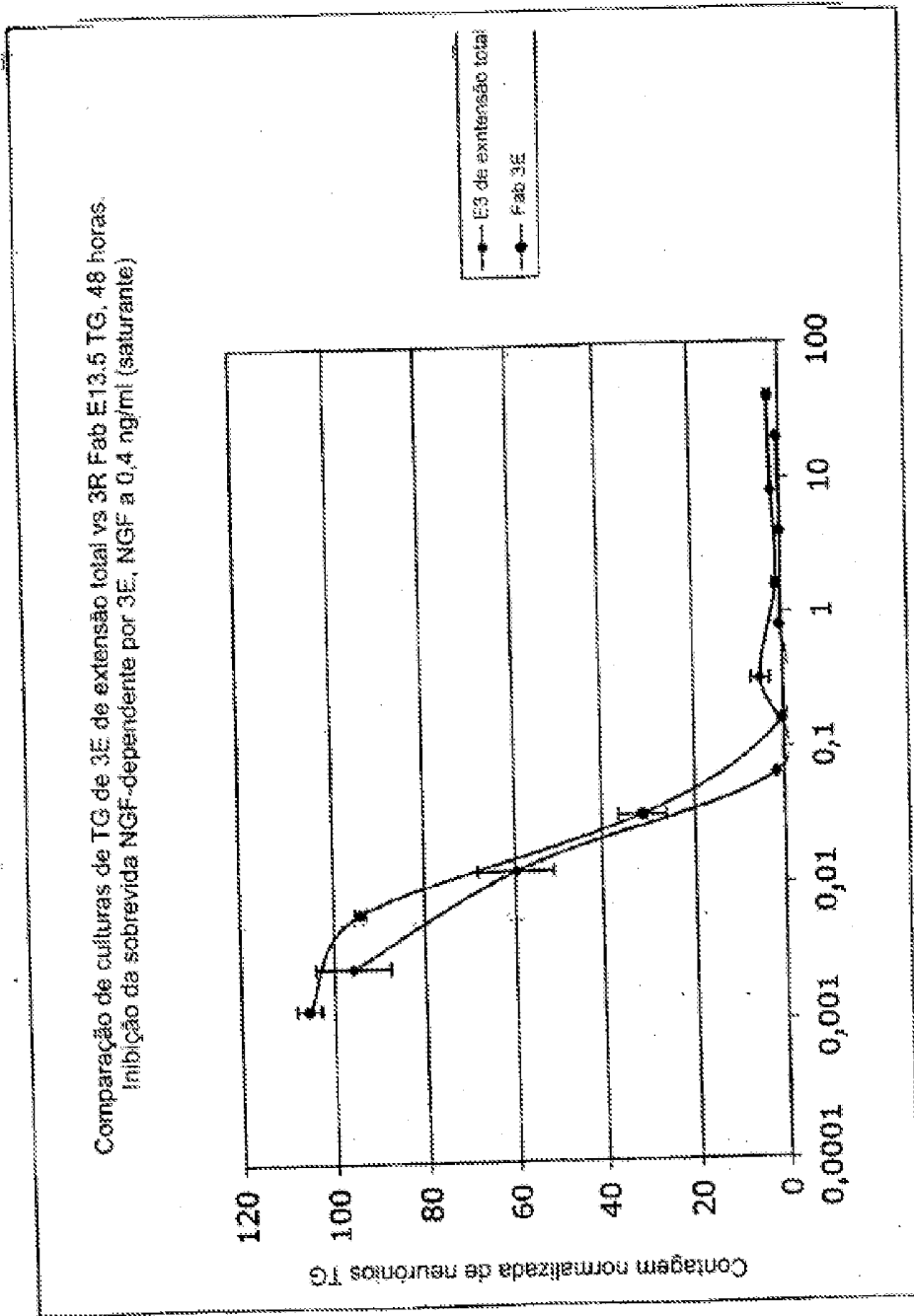
Fig. 10

Interação NCF-T1kA e NCF-P75
 Bloqueamento por anticorpo 3E



3E Fab nM

Fig. 11



Locais de ligação (nM)

Fig. 12

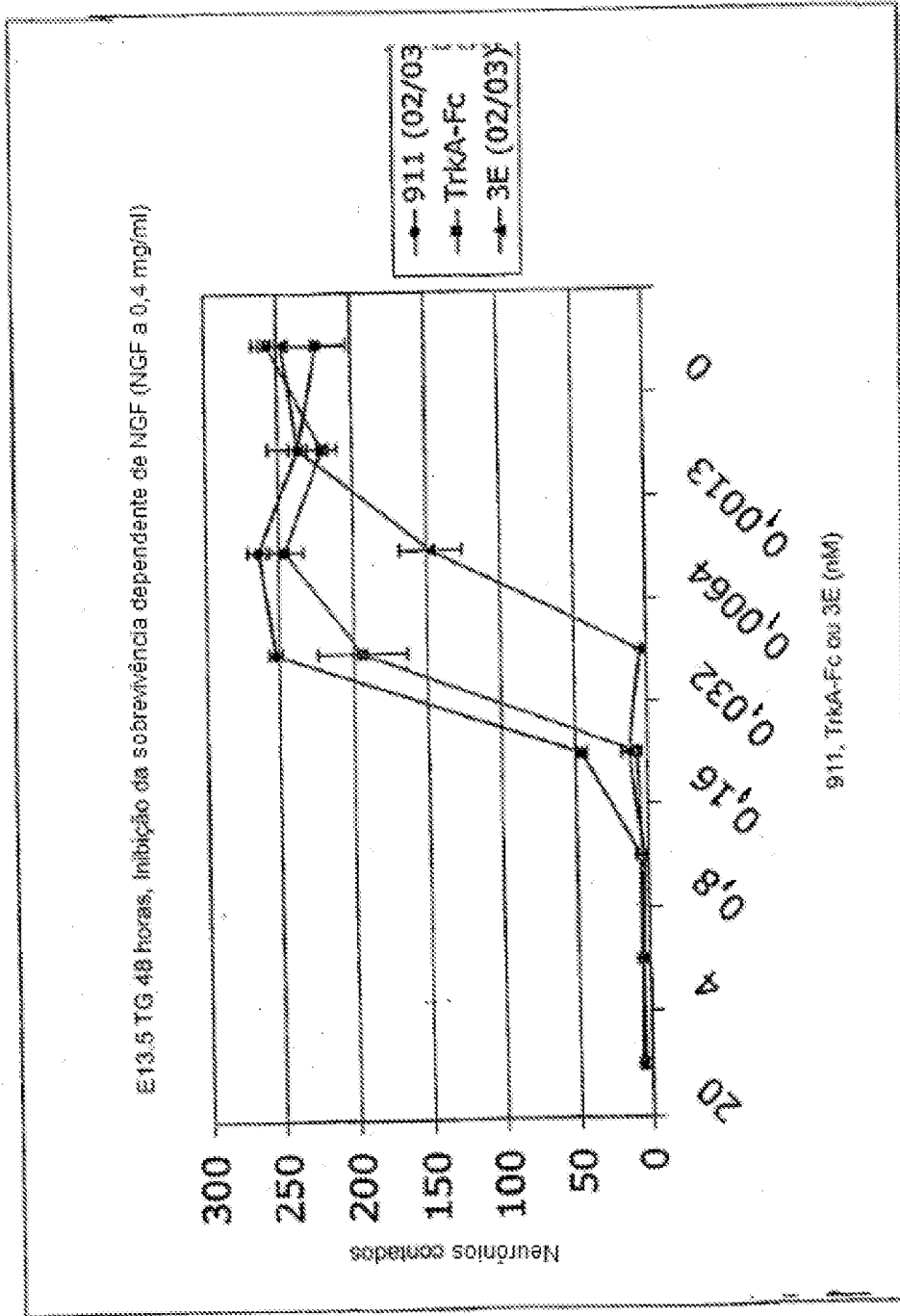


Fig. 13

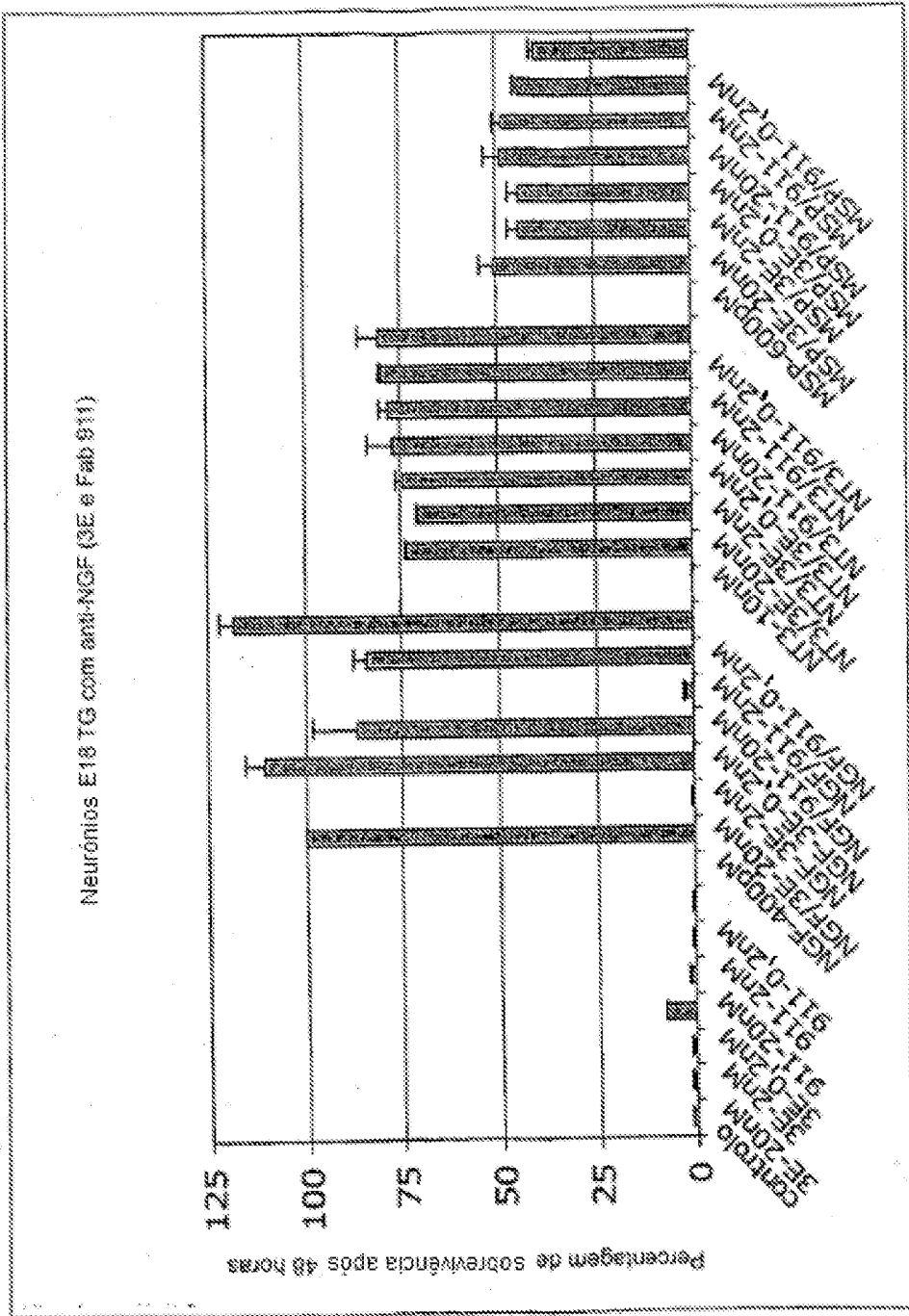


Fig. 14

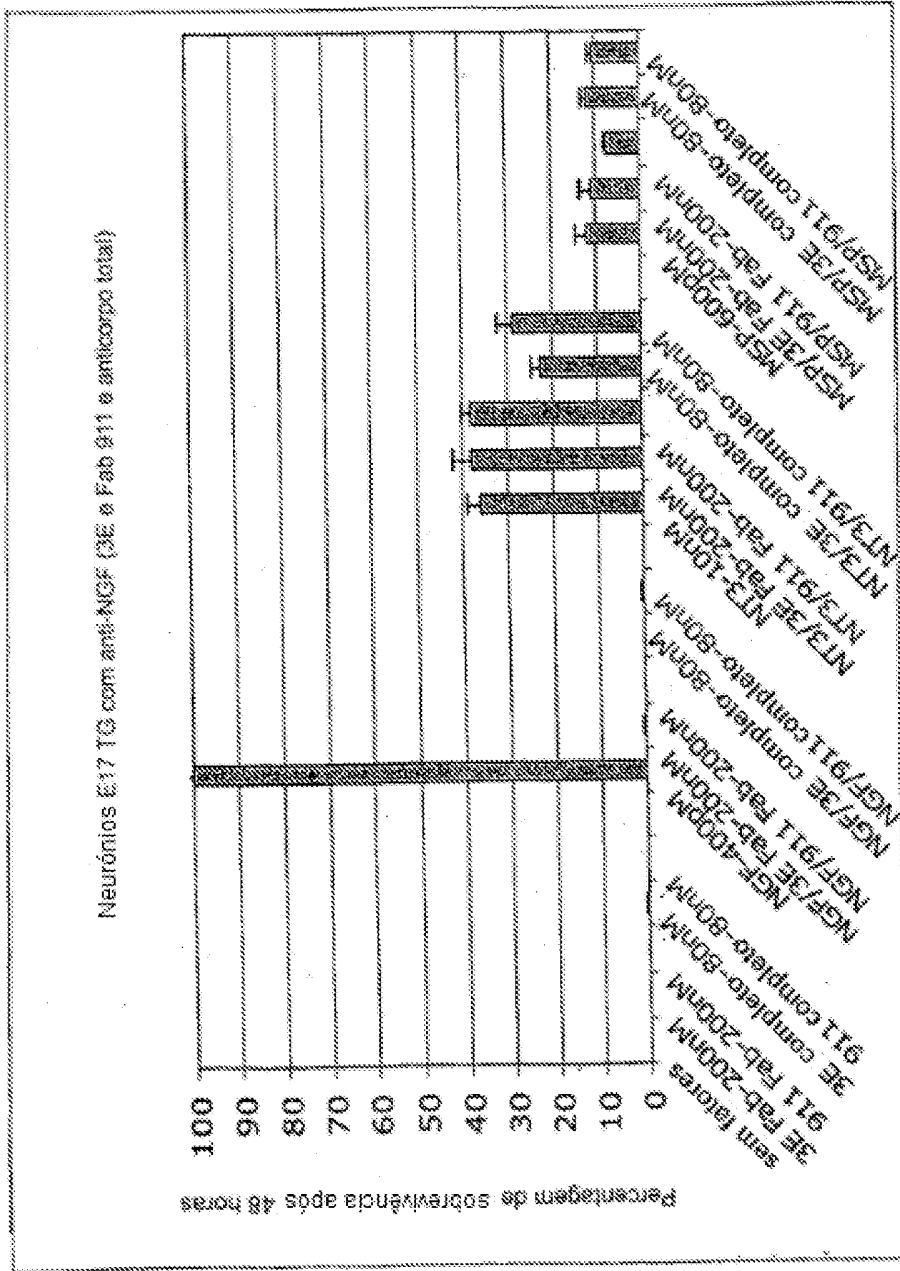


Fig. 15

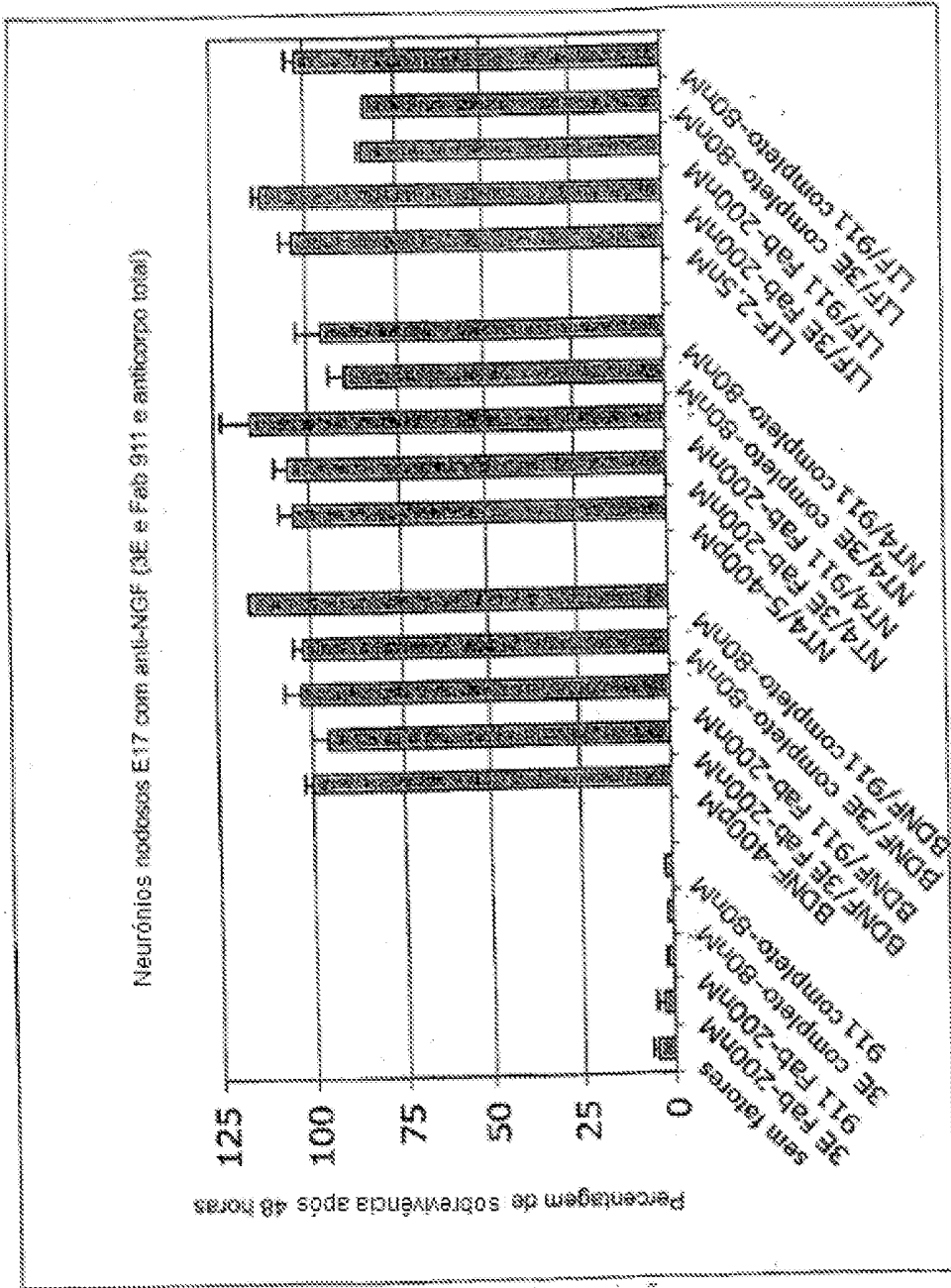


FIG. 16

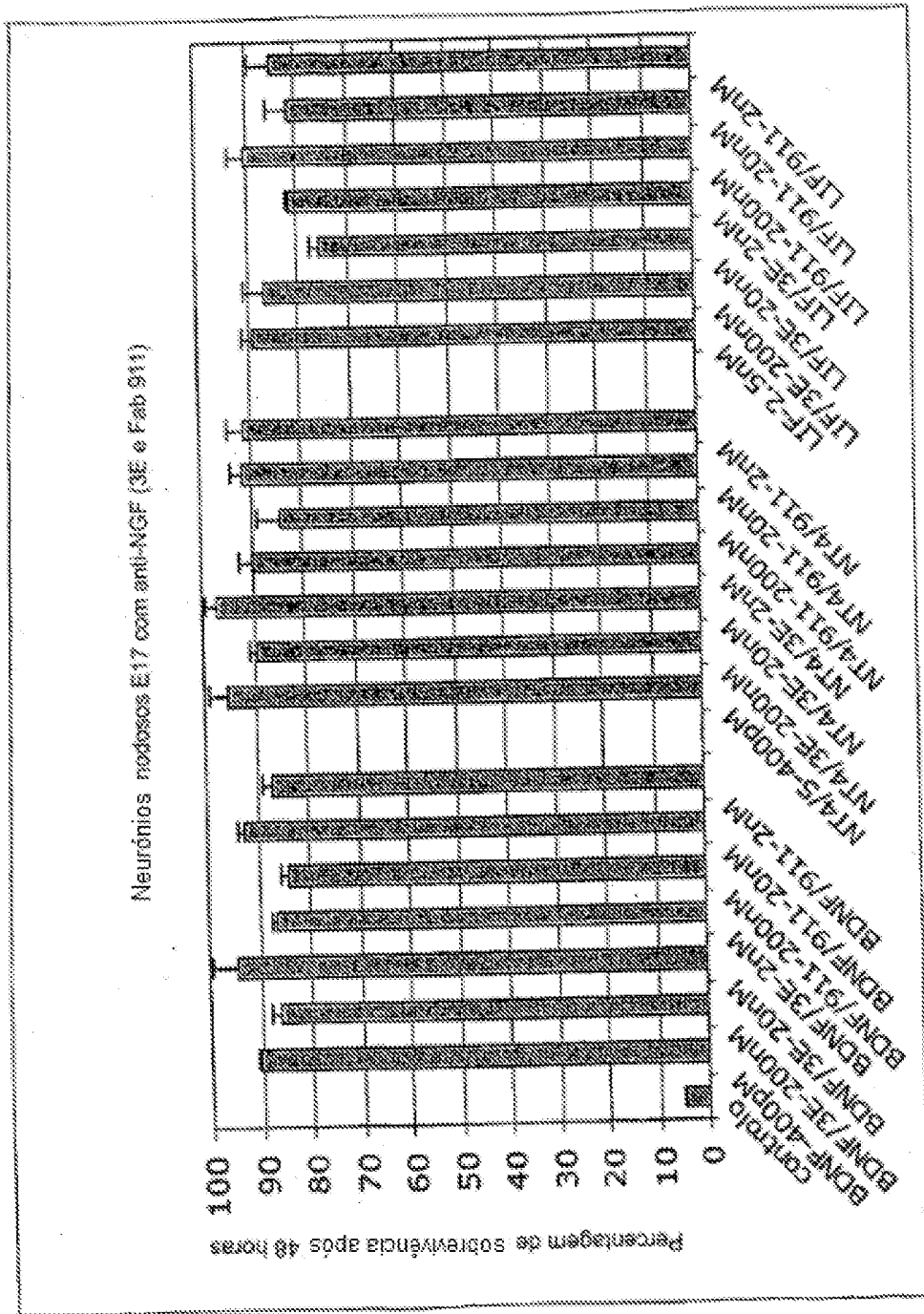


Fig. 17

FIG. 18

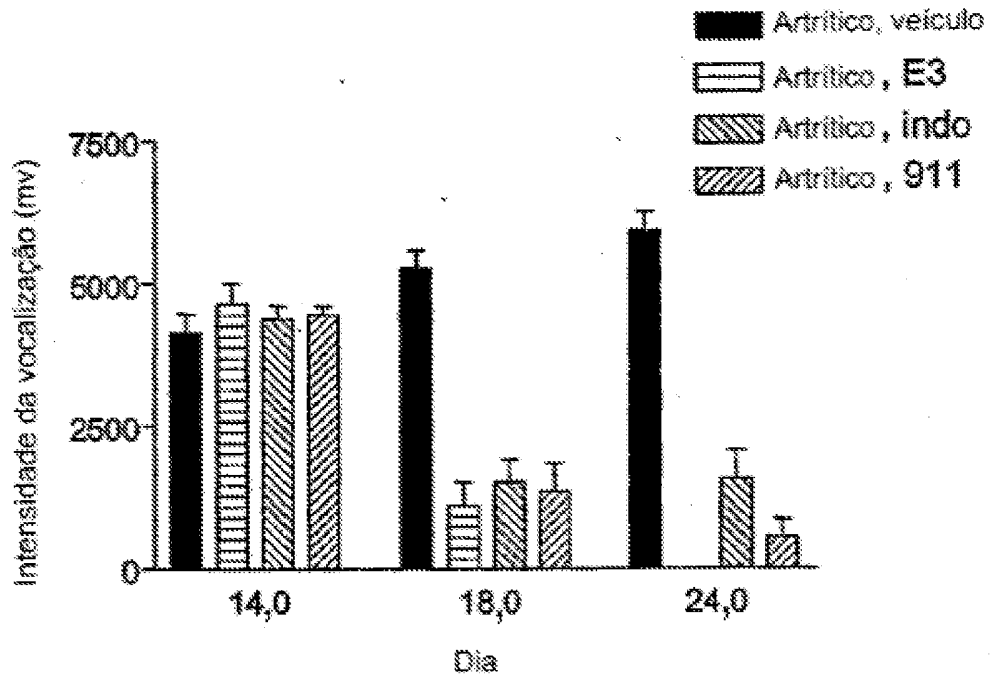


FIG. 19

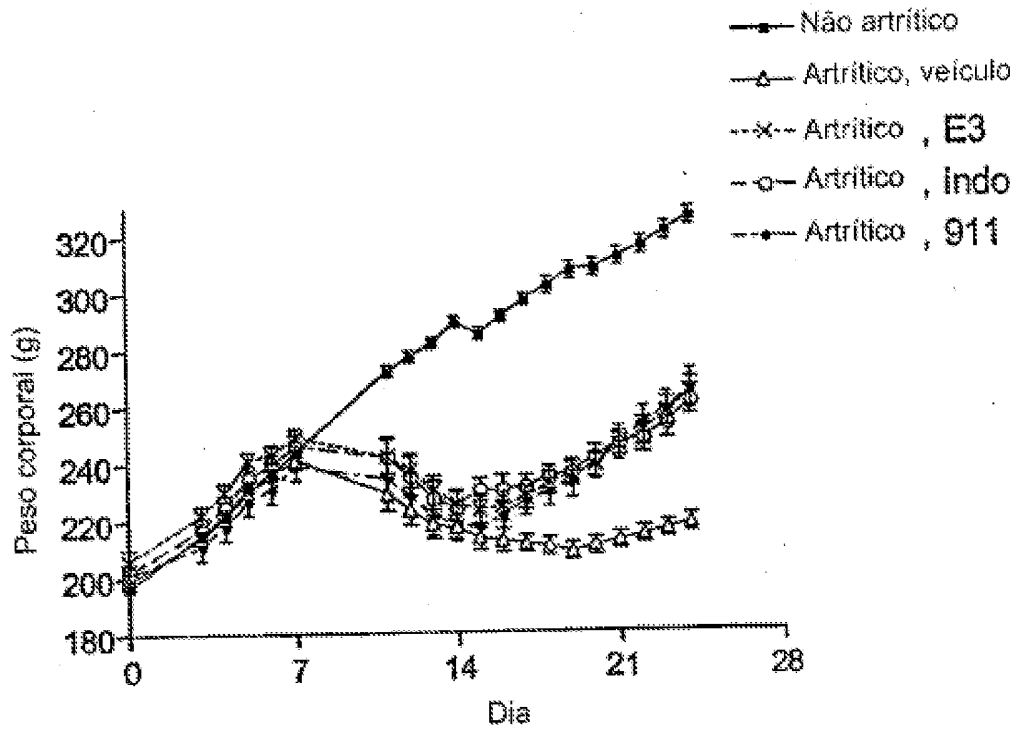
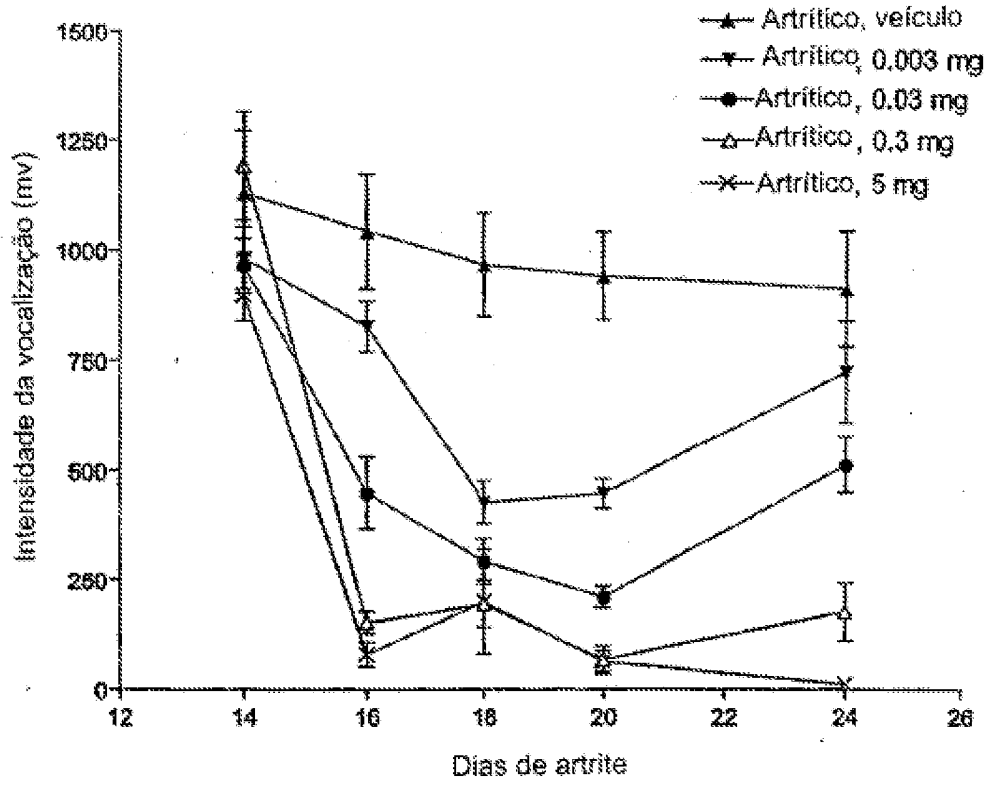


FIG. 20



koadsug

FIG. 21

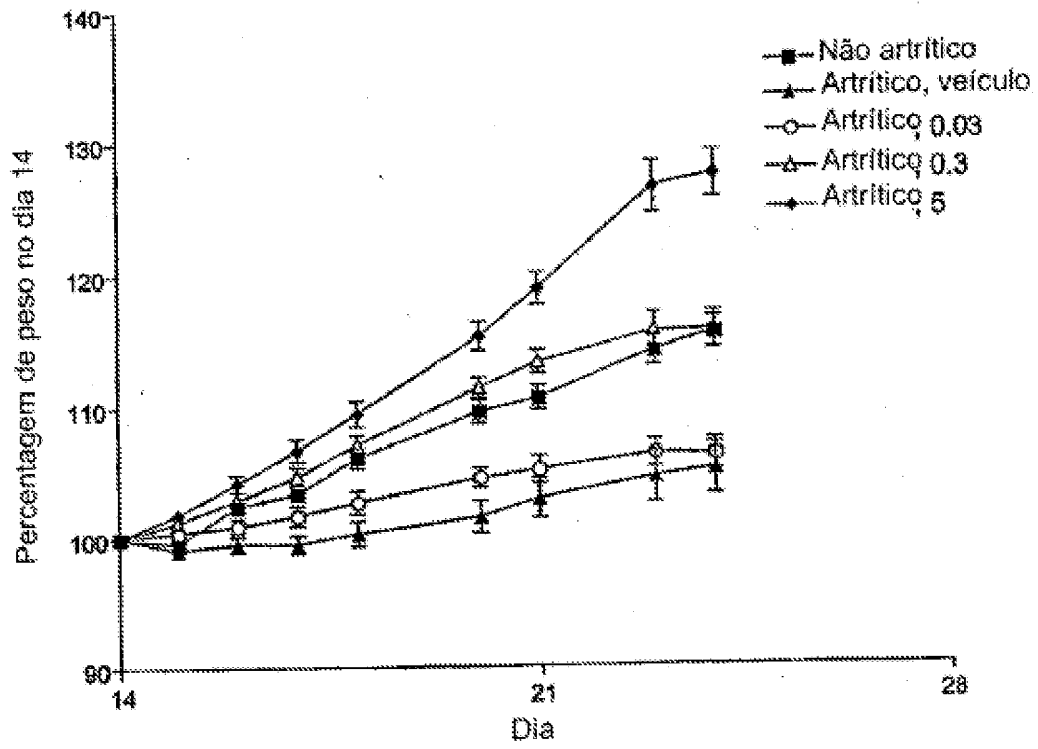


FIG. 22

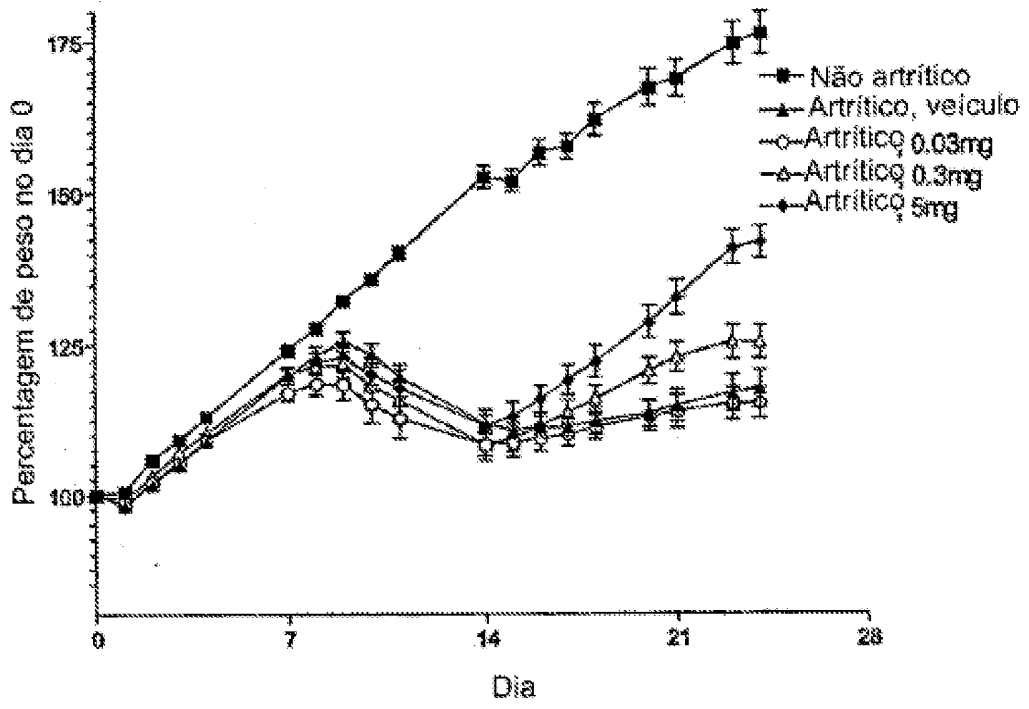


Fig. 23A

NUMERAÇÃO DE DOMÍNIO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA 3E

A-NUMERAÇÃO SEQUENCIAL DE PROTEÍNA

B-NUMERAÇÃO DE KABAT

C-NUMERAÇÃO DE CHOTHIA

CAIXAS: CDR COMO KABAT, SUBLINHADO = CDR 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 |
| Q | V | Q | L | Q | E | S | G | F | Q | L | V | E |
| 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 | Q |
| 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 | T | D | L | N | N | 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 | E | Q | L | E | N | I | G | I | I | N |
| 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 |
| Q | D | G | T | T | D | T | 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 |

Fig. 23A (continuação)

| | | | | | | H3 | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|------|
| 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 |
| V | Y | Y | C | A | R | G | G | Y | W | Y | 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 |
| 100E | 100C | 100D | 100E | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 |
| S | Y | Y | F | D | Y | W | G | Q | G | T | L | V |

117 118 119
 110 111 112
 110 111 112
 T V S

Fig. 23B

NUMERAÇÃO DE DOMÍNIO VARIÁVEL DE CADEIA LEVE 3E
 A-NUMERAÇÃO SEQUENCIAL DE PROTEÍNA
 B-NUMERAÇÃO DE KABAT
 C-NUMERAÇÃO DE CHOTHIA

Caixas: CDR COMO KABAT, SUBLINHADO = CDR 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 | M | 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 | G | D | R | V | T | I | T | C | R | A | S | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | | |
| <u>Q</u> | <u>S</u> | <u>I</u> | <u>E</u> | <u>N</u> | <u>N</u> | <u>L</u> | <u>N</u> | <u>N</u> | <u>Y</u> | <u>Q</u> | <u>Q</u> | <u>K</u> | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | L3 |
| 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 | |
| P | G | K | A | P | K | L | L | I | Y | V | T | S | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| 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>H</u> | <u>F</u> | <u>H</u> | <u>S</u> | <u>D</u> | <u>V</u> | <u>P</u> | <u>S</u> | <u>K</u> | <u>F</u> | <u>S</u> | <u>G</u> | <u>S</u> | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | | |
| G | R | G | 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 | P | R | D | I | A | T | Y | Y | C | <u>Q</u> | <u>Q</u> | <u>H</u> | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | |
| <u>H</u> | <u>T</u> | <u>L</u> | <u>P</u> | <u>Y</u> | <u>T</u> | <u>F</u> | <u>G</u> | <u>Q</u> | <u>G</u> | <u>T</u> | <u>K</u> | <u>L</u> | |

Fig. 23B (continuação)

| | | | | |
|-----|-----|------|-----|-----|
| 105 | 106 | 107 | 108 | 109 |
| 105 | 106 | 106A | 107 | 108 |
| 105 | 106 | 106A | 107 | 108 |
| E | I | K | R | T |

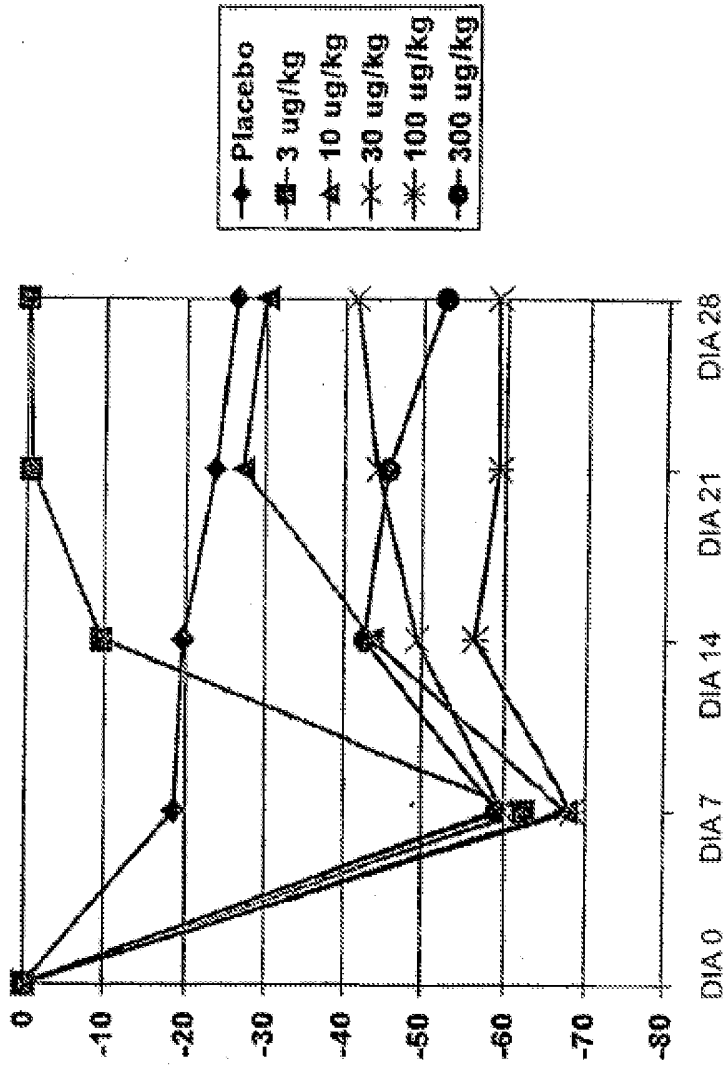


Fig. 24

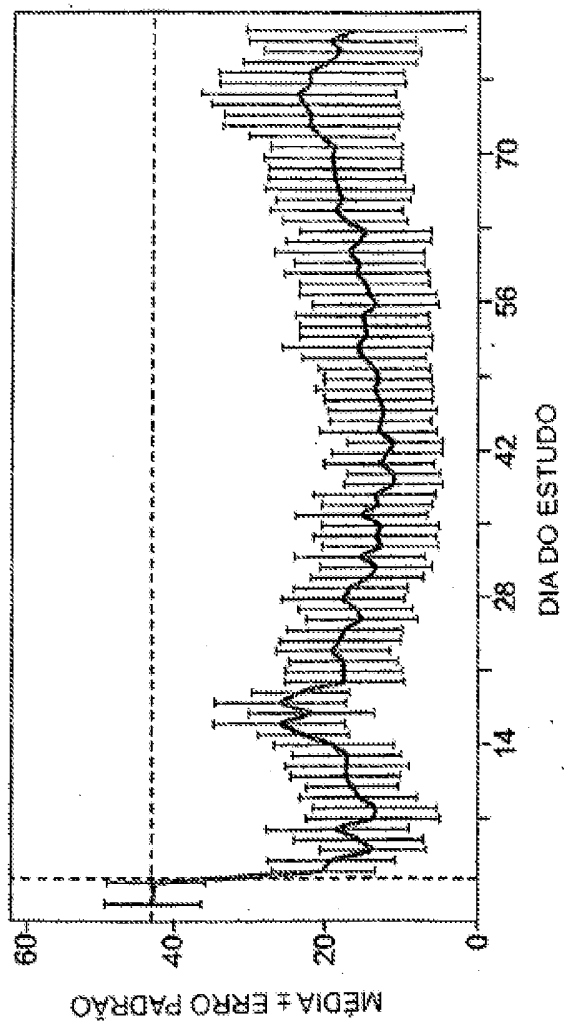


Fig. 25

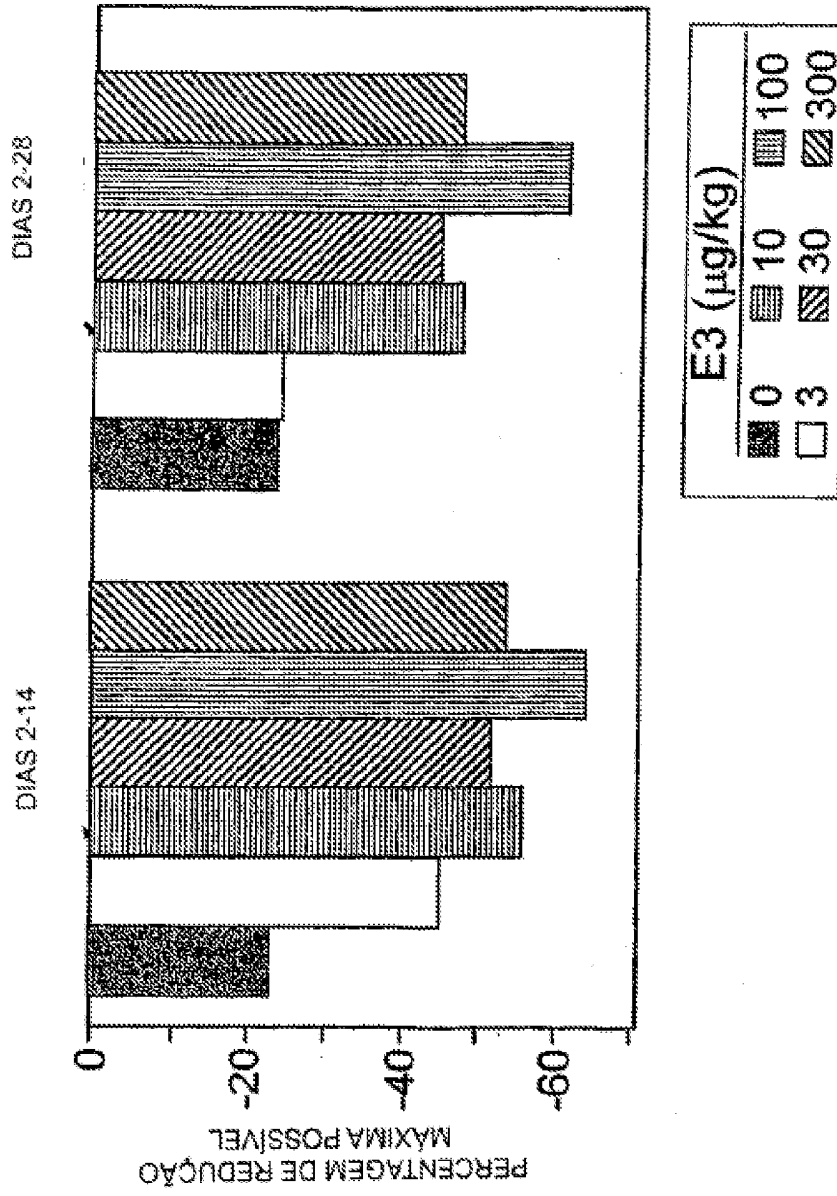


Fig. 26

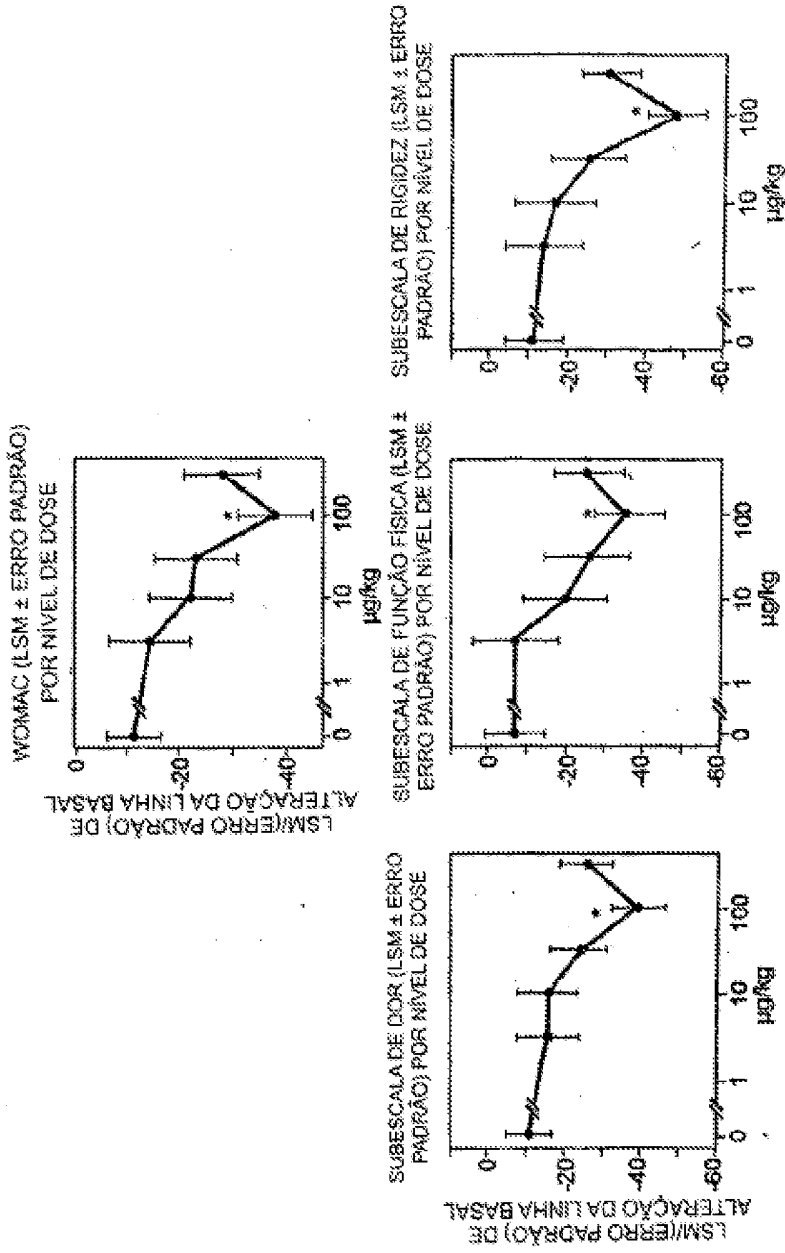


Fig. 27