

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

(22) Data de pedido: <b>2002.05.09</b>	(73) Titular(es): <b>GENENTECH, INC.</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2001.05.30 US 294392 P</b>	<b>1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO CA</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2004.03.31</b>	<b>94080-4990</b>	<b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2011.08.31</b> <b>225/2011</b>	(72) Inventor(es): <b>DAVID L. SHELTON</b>	<b>US</b>
	(74) Mandatário: <b>ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO</b>	
	<b>RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-NGF PARA O TRATAMENTO DE VÁRIOS DISTÚRBIOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE GENERICAMENTE A MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-NGF NO TRATAMENTO DE VÁRIOS DISTÚRBIOS RELACIONADO COM O NGF, INCLUINDO ASMA, ARTRITE E PSORÍASE. OS MÉTODOS SÃO EFICAZES NO TRATAMENTO DESTES DISTÚRBIOS NUM DOENTE SEM TEREM UM EFEITO ADVERSO SIGNIFICATIVO SOBRE O SISTEMA IMUNITÁRIO DO DOENTE.

## **RESUMO**

### **"ANTICORPOS ANTI-NGF PARA O TRATAMENTO DE VÁRIOS DISTÚRBIOS"**

A presente invenção refere-se genericamente a métodos de utilização de anticorpos anti-NGF no tratamento de vários distúrbios relacionado com o NGF, incluindo asma, artrite e psoríase. Os métodos são eficazes no tratamento destes distúrbios num doente sem terem um efeito adverso significativo sobre o sistema imunitário do doente.

## DESCRIÇÃO

### "ANTICORPOS ANTI-NGF PARA O TRATAMENTO DE VÁRIOS DISTÚRBIOS"

#### Antecedentes da Invenção

#### Campo da Invenção

A presente invenção refere-se genericamente a métodos de utilização de anticorpos anti-NGF como definido nas reivindicações, para o tratamento da dor crónica. Os métodos são eficazes no tratamento deste distúrbio num doente, sem ter um efeito adverso significativo sobre o sistema imunitário do doente.

#### Descrição da Técnica Relacionada

#### *Factor de Crescimento Nervoso (NGF)*

O factor de crescimento nervoso (NGF) foi a primeira neurotrofina a ser identificada e foi bem caracterizado o seu papel no desenvolvimento e sobrevivência de neurónios periféricos e centrais. O NGF revelou ser um factor de manutenção e sobrevivência fundamental no desenvolvimento de neurónios sensoriais simpáticos e embrionários periféricos e neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal (Smeynes et al., *Nature* **368**:246-249 (1994); Crowley et al., *Cell* **76**:1001-1011 (1994)). O NGF regula positivamente a expressão de neuropéptidos

em neurónios sensoriais (Lindsay e Harmer, *Nature* **337**:362-364 (1989)) e a sua actividade é mediada através de dois receptores ligados à membrana diferentes. O receptor da tirosina cinase TrkA medeia ligação de elevada afinidade e o receptor p75, que está relacionado estruturalmente com outros membros da família do receptor do factor da necrose tumoral, medeia ligação de baixa afinidade (Chao et al., *Science* **232**:518-521 (1986)).

Além dos seus efeitos sobre o sistema nervoso, o NGF tem sido cada vez mais envolvido em processos fora do sistema nervoso. Por exemplo, o NGF revelou intensificar a permeabilidade vascular (Otten et al., *Eur. J. Pharmacol.* **106**:199-201 (1984)), intensificar respostas imunitárias de células T e B (Otten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**:10059-10063 (1989)), induzir a diferenciação de linfócitos e a proliferação de mastócitos e causar a libertação de sinais biológicos solúveis a partir de mastócitos (Matsuda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **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)).

O NGF é produzido por vários tipos de célula incluindo mastócitos (Leon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **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) e células do músculo liso (Ueyama et al., *J. Hipertens.* **11**:1061-1065 (1993)). Os receptores do NGF têm sido encontrados em vários tipos de célula fora do sistema nervoso. Por exemplo, o TrkA foi encontrado em monócitos humanos, linfócitos T e B e mastócitos.

Tem sido observada uma associação entre níveis aumentados do NGF e vários estados inflamatórios em doentes humanos, assim como em vários modelos animais, consistente com um papel não-neuronal do NGF. 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. Venereol.* **78**:84-86 (1998)), artrite (Falcini et al., *Ann. Rheum. Dis.* **55**:745-748 (1996)) e asma (Braun et al., *Eur. J. Immunol.* **28**:3240-3251 (1998)). Os estados inflamatórios crónicos, tais como estes são um problema de saúde pública significativo. Por exemplo, é estimado que a artrite afecte 37,9 milhões de pessoas apenas nos Estados Unidos. As terapias existentes para tratar estes estados estão limitadas significativamente. Uma compreensão do papel que o NGF desempenha nestas doenças pode proporcionar novos métodos para as tratar.

Foi observada uma correlação entre stress e psoríase. Com base nesta correlação e na simetria das lesões cutâneas que acompanham a doença, foi proposta uma relação com o sistema nervoso (Raychaudhuri et al., *Acta Derm. Venercol.* **78**:84-86 (1998)). Em particular foi sugerido que os neuropéptidos desempenham um papel na patogénese da psoríase. Foi descrito por investigadores um número aumentado de nervos cutâneos terminais juntamente com uma regulação positiva de um ou mais dos neuropéptidos, tais como substância P (SP), polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) e CGRP. O NGF desempenha um papel na regulação da inervação na pele e é também conhecido por regular positivamente neuropéptidos, sugerindo que níveis aumentados de NGF podem ser responsáveis pela regulação positiva de neuropéptidos e pela inervação cutânea aumentada observada na psoríase. De facto, foi observada expressão aumentada do NGF em

queratinócitos psoriáticos (Raychaudhuri *et al.*, *Acta Derm. Venercol.* **78**:84-86 (1998)). Foi sugerido que enquanto o NGF funciona normalmente como um factor de sobrevivência de queratinócitos, a sobre expressão do NGF previne a morte celular normal, originando psoríase (Pincelli *et al.*, *J. Derm. Sci.* **22**:71-79 (2000)).

Vários estudos indicaram que neuropéptidos, tais como a substância P (SP) e os compostos biologicamente activos libertados a partir de mastócitos, tal como histamina, desempenham também um papel na artrite de ocorrência natural em humanos e na artrite induzida experimentalmente em modelos animais (ver e. g. Levine, J., *Science* **226**:547-549 (1984)). O NGF revelou afectar a desgranulação de mastócitos (Bruni *et al.*, *FEBS Lett.* **138**:190-193 (1982)) e libertação da substância P (Donnerer *et al.*, *Neurosci.* **49**:693-698 (1992)), envolvendo-o na patogénese da artrite.

Um nível elevado de NGF nos tecidos periféricos está, consistentemente, associado com hiperalgesia e com inflamação, e tem sido observado em várias formas de artrite. O sinóvio de doentes afectados por artrite reumatóide expressa níveis elevados de NGF enquanto tem sido descrito que o NGF é indetectável em sinóvio não-inflamado (Aloe *et al.*, *Arch. Rheum.* **35**:351-355 (1992)). Foram observados resultados semelhantes em ratos com artrite reumatóide induzida experimentalmente (Aloe *et al.*, *Clin. Exp. Rheumatol.* **10**:203-204 (1992)). Foram descritos níveis elevados de NGF em murganhos artríticos transgénicos juntamente com um aumento no número de mastócitos. (Aloe *et al.*, *J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects* **15**:139-143 (1993)). No entanto, NGF purificado injectado no sinóvio da articulação de ratos normais não induz a inflamação da

articulação do joelho, sugerindo que o NGF não desempenha um papel causador na artrite (Aloe *et al.*, *Growth Factors* **9**:149-155 (1993)).

Níveis elevados de NGF têm sido associados a inflamação alérgica e foi sugerido que isto esteja relacionado com a desgranulação dos mastócitos (Bonini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:10955-10960 (1996)).

São também observados níveis elevados de NGF na asma alérgica e na não-alérgica (Bonini *et al.*, *supra*). Mastócitos, eosinófilos e linfócitos T foram todos propostos como desempenhando um papel nesta doença inflamatória e a correlação entre os níveis séricos de NGF e os títulos de anticorpo IgE totais sugerem que o NGF contribua para a resposta imunitária inflamatória. A inflamação das vias aéreas induzida por um alergénio tem sido associada à produção local aumentada de NGF em murganhos e humanos (Braun *et al.*, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **118**:163-165 (1999)).

O NGF revelou regular o desenvolvimento de resposta hiperactiva aumentada das vias aéreas, uma característica da asma brônquica (Braun *et al.*, *Eur. J. Immunol.* **28**:3240-3251 (1998)). De facto, num estudo, o tratamento de murganhos sensibilizados com alergénio com o anticorpo anti-NGF preveniu o desenvolvimento da hipersensibilidade das vias aéreas após desafio local com alergénio (Braun *et al.*, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **118**:163-165 (1999)).

Apesar dos resultados promissores obtidos em murganhos, os efeitos adversos descritos de anticorpos neutralizantes anti-NGF sobre o sistema imunitário levantaram questões significativas

sobre a praticabilidade da utilização de anticorpos anti-NGF como um agente terapêutico na prevenção ou no tratamento da asma ou de outras doenças ou distúrbios em doentes humanos. Em particular Torcia *et al.*, *Cell* **85**:345-356 (1996) identificou o NGF como um factor de sobrevivência autócrina de linfócitos B de memória e demonstrou que a administração *in vivo* de anticorpos neutralizantes anti-NGF causou um esgotamento de células B de memória e eliminou respostas imunitárias específicas de antigénio secundárias em murganhos. Garaci *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:14013-14018 (1999) descreveram que o NGF é um factor de sobrevivência autócrina que resgata monócitos/macrófagos humanos do efeito de citopático causado pela infecção com HIV. Esta descrição, juntamente com as verificações de Torcia *et al.*, *supra*, sugerem que os anticorpos anti-NGF têm o potencial de comprometer o sistema imunitário do indivíduo tratado.

O documento WO 01/78698 A2 descreve a utilização de anticorpos anti-NGF no tratamento da dor visceral crónica. Em particular o documento WO 01/78698 divulga a utilização de um anti-soro anti-2.5S-NGF policlonal comercializado pela empresa Sigma Chemicals (EUA) sob a referência N-6655.

Braun *et al.* (*Eur. J. Immunol.* (1998) **28**:3240-3251) divulgam a utilização do mesmo soro de anticorpo policlonal num modelo de murganho de inflamação alérgica das vias aéreas e asma.

Ro *et al.* (Pain (1999) **79**: 265-274) descrevem a utilização do soro de anticorpo policlonal anteriormente referido em ratos no tratamento da dor neuropática.



Nenhum dos documentos acima divulga o anticorpo como definido nas reivindicações ou a sua vantagem de não ter qualquer efeito adverso significativo sobre o sistema imunitário.

#### Sumário da Invenção.

A presente invenção é baseada na verificação inesperada de que a administração *in vivo* de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo monoclonal anti-NGF (anticorpo 911) não apresentou qualquer efeito adverso sobre o sistema imunitário num modelo experimental da alergia em murganho. Consequentemente, este e os anticorpos relacionados sustentam grandes expectativas no tratamento de distúrbios associados com o NGF, incluindo a asma, em doentes humanos.

Num aspecto, a invenção refere-se a um método para controlar um distúrbio relacionado com o NGF num doente humano administrando ao doente uma quantidade eficaz de um anticorpo monoclonal anti-NGF humano (anti-hNGF) que é capaz de ligação a hNGF com uma afinidade na gama nanomolar e inibição da ligação de hNGF ao TrkA humano (hTrkA) *in vivo*, em que o anticorpo não apresenta quaisquer efeitos adversos significativos sobre o sistema imunitário do doente, como definido nas reivindicações

Numa forma de realização a afinidade de ligação do anticorpo a hNGF é, de um modo preferido, cerca de 0,10 a cerca de 0,80 nM, de um modo mais preferido, cerca de 0,15 a cerca de 0,75 nM e, de um modo ainda mais preferido, cerca de 0,18 a cerca de 0,72 nM.

Numa outra forma de realização, o anticorpo liga-se essencialmente ao mesmo epitopo hNGF que um anticorpo seleccionado do grupo consistindo de MAb 911, MAb 912 e MAb 938, de um modo mais preferido, o mesmo epitopo que MAb 911.

Ainda noutra forma de realização o anticorpo tem capacidade de reacção cruzada com NGF murino (muNGF).

O anticorpo pode ser também um fragmento de anticorpo, de um modo preferido, um fragmento de anticorpo seleccionado do grupo consistindo de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, diacorpos, moléculas de anticorpo de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticorpo e, de um modo mais preferido, uma molécula Fv (scFv) de cadeia única.

Noutra forma de realização, o anticorpo é quimérico. Pode ser também humanizado ou humano.

Ainda noutra forma de realização, o anticorpo é bi-específico. O anticorpo bi-específico pode ter uma especificidade anti-IgE.

O distúrbio relacionado com o NGF que é controlado está, de um modo preferido, não associado com o efeito do NGF sobre o sistema neuronal.

Numa forma de realização, o distúrbio relacionado com o NGF é um estado inflamatório, de um modo preferido, seleccionado do grupo consistindo de asma, artrite, esclerose múltipla, lúpus eritematoso e psoríase.

Numa forma de realização preferida o estado é asma. Numa outra forma de realização, o estado é artrite, de um modo preferido, artrite reumatóide. Ainda noutra forma de realização, a patologia é psoríase.

Ainda numa forma de realização adicional, o anticorpo é administrado em combinação com outro agente terapêutico para o tratamento de um estado inflamatório. Deste modo, o anticorpo pode ser administrado em combinação com outro agente terapêutico para o tratamento da asma. Numa forma de realização, o anticorpo é administrado com um corticosteróide, de um modo preferido, dipropionato de beclometsona (BDP). Noutra forma de realização, o anticorpo é administrado com um anticorpo anti-IgE, tais como rhuMAb-E25 ou rhuMAb-E26. Para o tratamento da artrite reumatóide, o anticorpo pode ser administrado em combinação com um anticorpo anti-TNF ou um anticorpo ou uma imuno-adesina ligando-se especificamente a um receptor TNF.

Num outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo monoclonal anti-NGF humano quimérico, humanizado ou humano, com capacidade de ligação a hNGF com uma afinidade na gama nanomolar e inibindo a ligação de hNGF ao TrkA humano *in vivo*, em que o anticorpo não apresenta qualquer efeito adverso significativo sobre o sistema imunitário de um doente, em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável. O anticorpo na composição farmacêutica pode ser um fragmento de anticorpo, de um modo preferido, um fragmento de anticorpo seleccionado do grupo consistindo de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, diacorpos, moléculas de anticorpo de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticorpo.

Numa forma de realização, o anticorpo é um anticorpo bi-específico. O anticorpo bi-específico pode ter capacidade de ligação específica a IgE humana nativa ou a TNF humano nativo ou a um receptor de TNF humano nativo.

Noutra forma de realização, a composição farmacêutica compreende ainda outro ingrediente farmacêuticamente activo, tal como um ingrediente adequado para o tratamento de um estado inflamatório. O estado inflamatório é, de um modo preferido, uma seleccionada do grupo consistindo de asma, esclerose múltipla, artrite, lúpus eritematoso e psoríase. Numa forma de realização, o estado inflamatório é asma. Noutra forma de realização o estado inflamatório é artrite, de um modo preferido, artrite reumatóide. Ainda noutra forma de realização o estado inflamatório é psoríase.

Num outro aspecto, a presente invenção refere-se a um artigo de produção compreendendo um recipiente, uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo monoclonal anti-NGF humano quimérico, humanizado ou humano, com capacidade de ligação a hNGF com uma afinidade na gama nanomolar e inibindo a ligação de hNGF ao TrkA humano *in vivo*, em que o anticorpo não apresenta qualquer efeito adverso significativo sobre o sistema imunitário de um doente, em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável e instruções para utilizar a composição de matéria para controlar um distúrbio relacionado com o NGF num doente humano, como definido nas reivindicações.

Numa forma de realização, o artigo de produção compreende um ingrediente farmacêuticamente activo adicional, de um modo preferido, adequado para o tratamento de um estado inflamatório. O estado inflamatório é, de um modo preferido, seleccionado do

grupo consistindo de asma, esclerose múltipla, artrite, lúpus eritematoso e psoríase.

#### Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 resume a capacidade de seis MAb anti-NGF para se ligarem a mutantes NGF/NT-3 quiméricos. É comparada a ligação relativa de cada MAb aos mutantes NGF/NT3 com a ligação de hNGF do tipo selvagem: (-), <10%; (+), 10-30%; (++) , 30-60%; (+++) , 60-100%. O  $EC_{50}$  de cada MAb para ligação a hNGF é: MAb 908,  $1,8 \times 10^{-10}$  M; MAb 911,  $3,7 \times 10^{-10}$  M; MAb 912,  $1,8 \times 10^{-10}$  M; MAb 938,  $7,4 \times 10^{-10}$  M; MAb 14.14,  $5,9 \times 10^{-10}$  M.

A figura 2A-F mostra a ligação de MAb a hNGF de tipo selvagem e mutante. Foram comparados os valores de  $EC_{50}$  médios para cada mutante obtidos em 2 a 5 análises ELISA independentes com valores de  $EC_{50}$  obtidos para ligação a NGF do tipo selvagem. Os valores de  $EC_{50}$  foram determinados por análise de regressão linear (não ponderada) utilizando o programa informático Kaleidagraph (Abelbeck Software). Os mutantes resultando numa redução de, pelo menos, duas vezes na ligação de MAb estão indicados com barras às riscas e os resíduos contribuidores estão marcados.

A figura 2A mostra a ligação de MAb 908 a NGF de tipo selvagem e mutante.

A figura 2B mostra a ligação de MAb 909 a NGF de tipo selvagem e mutante.

A figura 2C mostra a ligação de MAb 911 a NGF de tipo selvagem e mutante.

A figura 2a mostra a ligação de MAb 912 a NGF de tipo selvagem e mutante.

A figura 2E mostra a ligação de MAb 938 a NGF de tipo selvagem e mutante.

A figura 2F mostra a ligação de MAb 14.14 a NGF de tipo selvagem e mutante.

A figura 3A-F apresenta modelos moleculares de epitopos de MAb em NGF para, respectivamente, os MAb anti-NGF 908, 909, 911, 912, 938 e 14.14. As designações cinzentas claras e médias diferenciam cada monómero do NGF e os resíduos identificados por ELISA que afectam a ligação de MAb são mostrados a negro. Na Figura 3A está marcada cada uma das regiões variáveis.

A figura 4A e B mostra a análise de imunotransferência de MAb anti-NGF ligados a hNGF não-reduzido (A) e hNGF reduzido (B). Na primeira pista são visíveis os marcadores de peso molecular. Nas pistas 2 e 3 são mostrados, respectivamente, o tampão e um anticorpo de controlo negativo. Sob condições não-redutoras, o hNGF purificado foi separado como um conjunto triplo de bandas, que parecem corresponder a hNGF monomérico, dimérico e dimérico parcialmente processado.

A figura 5 resume os resultados de mapeamento do epitopo do MAb.

A figura 6 mostra que MAb anti-NGF inibiu a ligação de hNGF a uma imuno-adesina receptora TrkA-IgG.

A figura 7 mostra a capacidade de MAb anti-NGF para inibirem a ligação de hNGF a uma imuno-adesina p75-IgG.

A figura 8 mostra a capacidade de MAb anti-NGF para inibirem a ligação de hNGF ao domínio extracelular TrkA exposto em células CHO transfectadas. A inibição da fosforilação da tirosina foi medida por ELISA utilizando MAb anti-fosfotirosina.

A figura 9 mostra a capacidade de MAb anti-NGF para inibirem os efeitos de sobrevivência de hNGF em neurónios de gânglios da raiz dorsal de rato embrionário. A sobrevivência máxima foi baseada no sinal obtido com NGF apenas e a inibição máxima foi determinada pelo sinal obtido com a adição de concentrações saturantes de TrkA-IgG solúvel.

A figura 10 demonstra que o tratamento com MAb 911 anti-NGF não aumenta significativamente a resposta imunitária a ovalbumina.

A figura 11 mostra que após imunização com gama-globulina de galinha, o tratamento com MAb 911 anti-NGF não reduz significativamente a resposta imunitária.

A figura 12 mostra que o tratamento com MAb 911 anti-NGF bloqueia a hiperalgesia térmica induzida por NGF.

A figura 13 mostra que em murganhos C57/BL6 sensibilizados (SN), o tratamento com MAb 911 anti-NGF inibe a hiper-reactividade das vias aéreas após desafio com antigénio de ácaros inalado.

A figura 14 mostra que em murganhos C57/BL6 sensibilizados (SN), o tratamento com MAb anti-NGF reduz a infiltração de leucócitos, linfócitos e eosinófilos em BAL após desafio com antigénio de ácaros inalado.

A figura 15 mostra que embora a infiltração celular em BAL seja reduzida em murganhos sensibilizados tratados com MAb anti-NGF, a proporção de eosinófilos permanece elevada.

A figura 16 mostra que o tratamento com MAb 911 anti-NGF atenua o aumento de IL-13 em BAL após desafio com antigénio.

A figura 17 demonstra que apesar da sua capacidade para reduzir a resposta inflamatória ao alérgénio, o tratamento com MAb anti-NGF não reduz a resposta imunitária humoral como medida pelo título de imunoglobulina de soro total para os ácaros.

A figura 18 mostra que o tratamento com MAb anti-NGF também não reduz o nível de soro total de IgE.

A figura 19 mostra que o tratamento com NGF aumenta os níveis de CGRP no gânglio trigeminal, enquanto o tratamento com MAb anti-NGF produz uma redução nos níveis de CGRP.



## Descrição Detalhada da Forma de Realização Preferida

### A. Definições

A menos que definido de outra forma, os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que o normalmente entendido por um comum especialista na técnica a que esta invenção pertence. Ver, e. g. Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 2<sup>a</sup> ed, J. Wiley & Sons (Nova Iorque, NI 1994); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NI 1989). Um especialista na técnica irá reconhecer muitos métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos, que podem ser utilizados na realização da presente invenção. De facto, a presente invenção não está de modo algum limitada aos métodos e materiais descritos. Para os objectivos da presente invenção, são definidos os termos seguintes abaixo.

Como aqui utilizado, os termos “factor de crescimento nervoso” e “NGF” são definidos como todas as espécies de sequências nativas de NGF de mamífero, incluindo as humanas.

“Receptor de NGF” refere-se a um polipéptido que está ligado por ou activado por NGF. Os receptores de NGF incluem o receptor TrkA e o receptor p75 de qualquer espécie de mamífero, incluindo humanos.

O termo “sequência nativa” em relação a NGF ou a qualquer outro polipéptido refere-se a um polipéptido que tem a mesma sequência de aminoácidos que um polipéptido correspondente derivado da natureza, independentemente do seu modo de preparação. Esse polipéptido de sequência nativa pode ser

isolado da natureza ou pode ser produzido por meios recombinantes e/ou sintéticos ou qualquer sua combinação. O termo “sequência nativa” abrange especificamente formas truncadas ou segregadas de ocorrência natural (e. g., uma sequência do domínio extracelular), formas de variantes de ocorrência natural (e. g., formas de splice alternativo) e variantes alélicas de ocorrência natural dos polipéptidos completos.

“Anticorpos” (Ab) e “imunoglobulinas” (Ig) são glicoproteínas tendo as mesmas características estruturais. Enquanto anticorpos apresentam especificidade de ligação para um antígeno específico, as imunoglobulinas incluem anticorpos e outras moléculas semelhantes a um anticorpo que não possuem especificidade para um antígeno. Os polipéptidos do último tipo, por exemplo, são produzidos em níveis baixos pelo sistema linfático e em níveis aumentados pelos mielomas.

“Anticorpos nativos e imunoglobulinas” são normalmente glicoproteínas heterotetraméricas com cerca de 150000 daltons, compostas por duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas idênticas (H). Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada por uma ligação persulfureto covalente, enquanto o número de ligações persulfureto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulinas. Cada cadeia pesada e leve tem também pontes persulfureto intracadeia espaçadas regularmente. Cada cadeia pesada tem numa extremidade um domínio variável (VH) seguido por vários domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável numa extremidade (VL) e um domínio constante na sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada e o domínio variável da cadeia leve está alinhado

com o domínio variável da cadeia pesada. Pensa-se que resíduos de aminoácido particulares formem uma interface entre os domínios variáveis de cadeia leve e pesada (Chothia *et al.* *J. Mol. Biol.* **186**:651 [1985]; Novotny e Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**:4592 [1985]; Chothia *et al.*, *Nature* **342**: 877-883 [1989]).

O termo "variável" refere-se ao facto que determinadas porções dos domínios variáveis diferirem significativamente em termos de sequência entre anticorpos e são utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular ao seu antigénio particular. No entanto, a variabilidade não está distribuída igualmente ao longo dos domínios variáveis dos anticorpos. Esta está concentrada em três segmentos designados regiões determinantes da complementaridade (CDR) ou regiões hipervariáveis nos domínios variáveis de cadeia leve e nos de cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são designadas estruturais (FR). Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves nativas compreendem cada, quatro regiões FR, basicamente adoptando uma configuração em folha  $\beta$ , ligada por três CDR, que formam ansas ligando e, em alguns casos constituindo parte da estrutura em folha  $\beta$ . As CDR em cada cadeia são mantidas em conjunto em grande proximidade pelas regiões FR e, com as CDR da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação ao antigénio dos anticorpos (ver Kabat *et al.* (1991) *supra*). Os domínios constantes não estão envolvidos directamente na ligação de um anticorpo a um antigénio, mas apresentam várias funções efectoras, tal como a participação do anticorpo na toxicidade celular dependente dos anticorpos.

A digestão de anticorpos com papaína produz dois fragmentos de ligação ao antígeno idênticos, designados fragmentos "Fab", cada um com um único local de ligação ao antígeno e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflecte a sua capacidade para cristalizar facilmente. O tratamento com pepsina produz um fragmento  $F(ab')_2$  que tem dois locais de combinação com o antígeno e tem ainda capacidade de reticular o antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local completo de reconhecimento e de ligação ao antígeno. Numa espécie de Fv com duas cadeias, esta região consiste num dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de leve em associação próxima, não-covalente. Em espécies de Fv de cadeia única, pode ser ligado covalentemente um domínio variável de cadeia pesada e um de leve através de um elemento de ligação peptídico flexível de forma a que as cadeias leves e pesadas se possam associar numa estrutura "dimérica" análoga à presente numa espécie de Fv de duas cadeias. É nesta configuração que as três CDR de cada domínio variável interagem, para definir um local de ligação ao antígeno na superfície do VH-VL dímero. Colectivamente, as seis CDR conferem especificidade de ligação ao antígeno ao anticorpo. No entanto, mesmo um domínio variável único (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDR específicas para um antígeno) tem a capacidade para reconhecer e ligar-se ao antígeno, embora com uma afinidade mais baixa do que o local de ligação completo.

O fragmento Fab contém também o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab, pela adição de alguns resíduos no terminal carboxilo do domínio CH1 da cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de charneira do

anticorpo. O Fab'-SH é a designação aqui de Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes contém um grupo tiol livre. Foram produzidos originalmente fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticorpos como pares de fragmentos Fab' que têm cisteínas de charneira entre si. São também conhecidas outras ligações químicas de fragmentos de anticorpo.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser classificadas num de dois tipos claramente distintos, designados  $\kappa$  e  $\lambda$ , com base nas sequências de aminoácido dos seus domínios constantes.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser classificadas em classes diferentes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias destas podem ser ainda divididas em subclasses (isotipos), e. g., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Os domínios constantes da cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são designados, respectivamente,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$   $\gamma$  e  $\mu$ . São bem conhecidas as estruturas das subunidades e as configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas.

O termo "anticorpo" abrange especificamente, anticorpos monoclonais, incluindo clones de fragmentos de anticorpos.

"Fragmentos de anticorpos" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, geralmente a região de ligação ao antigénio ou variável do anticorpo intacto. Os exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> e Fv; diacorpos; moléculas de anticorpo de cadeia única, incluindo moléculas Fv

de cadeia única (scFv); e anticorpos multiespecíficos, tal como anticorpos bi-específicos, formados a partir de fragmentos de anticorpo.

O termo “anticorpo monoclonal” como aqui utilizado refere-se a um anticorpo (ou fragmento de anticorpo) obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, *i. e.*, os anticorpos individuais compreendidos a população são idênticos, excepto por possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades menores. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único local antigénico. Além disso, ao contrário de preparações de anticorpos convencionais (policlonais) que incluem tipicamente anticorpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epitopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antigénio. Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos por estes serem sintetizados por cultura de hibridomas e não serem contaminados por outras imunoglobulinas. O modificador “monoclonal” indica o carácter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos e não deve ser interpretado como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser preparados pelo método do hibridoma inicialmente descrito por Kohler *et al.*, *Nature*, **256**:495 (1975) ou podem ser preparados por métodos de ADN recombinante (ver, *e. g.*, Patente U.S. Nº 4816567). Os “anticorpos monoclonais” incluem também clones de fragmentos de anticorpos de reconhecimento de antigénio e contendo locais de ligação (clones Fv), isolados a partir de bibliotecas de anticorpos em fagos utilizando, por exemplo, as

técnicas descritas em Clackson *et al.*, *Nature*, **352**:624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **222**:581-597 (1991).

Os anticorpos monoclonais aqui, especificamente incluem anticorpos “quiméricos” (imunoglobulinas) em que uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencendo a uma classe de anticorpo ou subclasse particular, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencendo a outra classe ou subclasse de anticorpo, assim como fragmentos desses anticorpos, desde que estes apresentem a actividade biológica pretendida (Patente U. S. Nº 4816567 de Cabilly *et al.*; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:6851-6855 [1984]).

As formas “humanizadas” de anticorpos não-humanos (e. g., murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulinas ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> ou outras subsequências de anticorpos de ligação ao antigénio) que contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não-humana. Na sua maioria, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) em que os resíduos provenientes de uma região determinante da complementaridade (CDR) do receptor são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não-humana (anticorpo dador), tal como murganho, rato ou coelho tendo a especificidade, afinidade e capacidade pretendida. Em alguns casos, os resíduos da região estrutural de Fv (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não-humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender os resíduos que não são encontrados nem no anticorpo receptor nem na CDR

importada ou sequências estruturais. Estas modificações são realizadas para refinar e otimizar adicionalmente o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender substancialmente a totalidade de, pelo menos, um e tipicamente dois, domínios variáveis, em que a totalidade ou substancialmente a totalidade das regiões CDR corresponde às de uma imunoglobulina não-humana e a totalidade ou substancialmente a totalidade das regiões FR é as de uma sequência de uma imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado irá também compreender optimamente, pelo menos, uma porção de uma região constante de uma imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, ver Jones *et al.*, *Nature*, **321**:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, **332**:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, **2**:593-596 (1992); e Clark, *Immunol. Today* **21**: 397-402 (2000). O anticorpo humanizado inclui um anticorpo Primatized™ em que a região de ligação ao antigénio do anticorpo é derivada de um anticorpo produzido imunizando macacos de cauda de leão com o antigénio de interesse.

“Fv de cadeia única” ou fragmentos de anticorpo “scFv” compreendem os domínios do anticorpo VH e VL, em que estes domínios estão presentes numa cadeia polipeptídica única. Geralmente, o polipéptido scFv compreende ainda um elemento de ligação polipeptídico entre os domínios VH e VL, que permite ao scFv formar a estrutura de ligação ao antigénio pretendida. Para uma revisão de scFv ver Pluckthun, em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol 113, Rosenberg e Moore ed., Springer-Verlag, Nova Iorque, pp. 269-315 (1994), Dall’Acqua e Carter, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 443-450 (1998) e Hudson, *Curr. Opin. Immunol* **11**: 548-557 (1999).



O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpo com dois locais de ligação ao antigénio, cujos fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) ligado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica (VH - VL). Pela utilização de um elemento de ligação que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e a criarem dois locais de ligação ao antigénio. Os diacorpos são descritos mais detalhadamente, por exemplo, nos documentos EP 404097; WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:6444-6448 (1993).

Um anticorpo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais irão interferir com utilizações em diagnóstico ou terapêuticas do anticorpo e podem incluir enzimas, hormonas e outro solutos proteicos ou não-proteicos. Em formas de realização preferidas, o anticorpo ser irá purificado (1) a mais de 95% em peso de anticorpo como determinado pelo método de Lowry e, de um modo muito preferido, mais de 99% em peso, (2) num grau suficiente para obter, pelo menos, 15 resíduos do terminal N ou a sequência de aminoácidos interna por utilização de um sequenciador de taça giratória ou (3) até à homogeneidade por SDS-PAGE em condições redutoras ou não-redutoras utilizando azul de Coomassie ou, de um modo preferido, coloração com prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes uma vez que não irá estar presente, pelo menos, um componente do ambiente natural do anticorpo. Normalmente, no entanto, o anticorpo isolado irá ser preparado através de, pelo menos, um passo de purificação.

Por “anticorpo neutralizante” pretende-se significar uma molécula de anticorpo que tem capacidade de bloquear ou reduzir significativamente, uma função efectora de um antigénio alvo ao qual este se liga. Consequentemente, um anticorpo anti-NGF “neutralizante” tem capacidade de bloquear ou de reduzir significativamente uma função efectora, tal como ligação ao receptor e/ou promoção de uma resposta celular, de NGF. Uma redução “significativa” significa pelo menos, cerca de 60%, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 70%, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 75%, de um modo ainda mais preferido, pelo menos, cerca de 80%; de um modo ainda mais preferido, pelo menos, cerca de 85%, de um modo muito preferido, pelo menos, redução cerca de 90% de uma função efectora do antigénio alvo (e. g. NGF).

Um anticorpo tem capacidade de “inibir a ligação” de um ligando a um receptor quando tem capacidade para produzir uma redução objectivamente mensurável na capacidade do ligando se ligar ao receptor.

O termo “epitopo” é utilizado para se referir a locais de ligação para anticorpos (monoclonais ou policlonais) em antigénios proteicos.

Os anticorpos que se ligam a um epitopo particular podem ser identificado por “mapeamento de epitopo.” Existem muitos métodos conhecidos na técnica para mapear e caracterizar a posição de epitopos em proteínas, incluindo a resolução da estrutura cristalina de um complexo anticorpo-antigénio, ensaios de competição, ensaios de expressão de fragmento de genes e ensaios baseados em péptidos sintéticos, como descrito, por exemplo, no Capítulo 11 de Harlow e Lane, *Using Antibodies*, a

*Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1999. Os ensaios de competição são discutidos abaixo. De acordo com os ensaios de expressão de fragmento genéticos, a grelha de leitura aberta codificando a proteína é fragmentada aleatoriamente ou por construção genética específica e é determinada a reactividade dos fragmentos expressos da proteína com o anticorpo a ser testado. Podem ser produzidos fragmentos de genes, por exemplo, por PCR e depois transcritos e traduzidos em proteína *in vitro*, na presença de aminoácidos radioactivos. A ligação do anticorpo aos fragmentos de proteína marcados radioactivamente é então determinada por electroforese em gel e imunoprecipitação. Podem ser também identificados alguns epitopos utilizando as grandes bibliotecas das sequências peptídicas aleatórias apresentadas na superfície de partículas de fago (bibliotecas de fago). Alternativamente, pode ser testada uma biblioteca definida de fragmentos peptídicos sobrepostos para ligação ao anticorpo do teste em ensaios de ligação simples. A última abordagem é adequada para definir epitopos lineares com cerca de 5 a 15 aminoácidos.

Um anticorpo liga-se “essencialmente ao mesmo epitopo” que um anticorpo de referência, quando os dois anticorpos reconhecem epitopos idênticos ou sobrepostos estericamente. Os métodos mais rápidos e amplamente utilizados para determinar se dois epitopos se ligam a epitopos idênticos ou sobrepostos estericamente são ensaios de competição, que podem ser configurado em vários formatos diferentes, utilizando antigénio marcado ou anticorpo marcado. Normalmente, o antigénio é imobilizado em placas de 96 poços e é medida a capacidade dos anticorpos não marcados para bloquear as ligações de anticorpos marcados utilizando marcações radioactivas ou enzimáticas.

O termo aminoácido ou resíduo de aminoácido, como aqui utilizado, refere-se a aminoácidos L ou a aminoácidos D de ocorrência natural como descritos mais abaixo no que respeita a variantes. São aqui utilizadas abreviaturas de uma e de três letras normalmente utilizadas para os aminoácidos (Bruce Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc., Nova Iorque (3<sup>a</sup> ed. 1994)).

“Variantes” são anticorpos que diferem de alguma forma dos anticorpos nativos conservando a mesma actividade biológica. As variantes podem ter uma sequência de aminoácidos que difere da sequência do anticorpo nativo em consequência de uma inserção, eliminação, modificação e/ou substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos dentro da sequência nativa. As variantes podem ter um padrão de glicosilação diferente dos anticorpos nativos. Além disso, as variantes podem ser anticorpos nativos que foram modificados covalentemente.

Um “distúrbio” é qualquer estado que poderá beneficiar do tratamento de acordo com a presente invenção. “Distúrbio” e “estado” são aqui utilizados de modo intermutável e incluem distúrbios ou doenças crónicos e agudos, incluindo os estados patológicos que predispõem o mamífero para o distúrbio em questão. Os exemplos não-limitantes de distúrbios a serem tratados aqui incluem lúpus eritematoso, dermatite de contacto, eczema, zona, neuralgia pós-herpética, hiperalgesia, dor crónica, doença do intestino irritável, doença de Crohn, colite, cistite da bexiga, esclerose múltipla, asma, psoríase e artrite, incluindo artrite crónica e artrite reumatóide. Um distúrbio preferido, a ser tratado de acordo com a presente invenção é um estado inflamatório, tal como asma, esclerose múltipla, artrite, lúpus eritematoso e psoríase.

Uma “estado inflamatório” é um estado caracterizado por um ou mais de dor, calor, rubor, inchaço e perda da função e está associada com ferimento, infecção, irritação ou danos em tecidos.

O termo “estado de doença” refere-se a um estado fisiológico de uma célula ou de um mamífero na sua totalidade em que ocorreu uma interrupção, cessação ou distúrbio de sistemas de funções celulares ou corporais ou de órgãos.

O termo “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” refere-se a uma quantidade de um fármaco eficaz para tratar e/ou prevenir uma doença, distúrbio ou estado fisiológica não pretendida num mamífero. Na presente invenção, uma “quantidade eficaz” de um anticorpo anti-NGF pode prevenir, reduzir, retardar ou atrasar o estabelecimento de um distúrbio tal como lúpus, esclerose múltipla, asma, psoríase ou artrite; reduzir, prevenir ou inibir (*i. e.*, retardar em alguma extensão e, de um modo preferido, terminar) o desenvolvimento de um distúrbio, tal como lúpus, esclerose múltipla, asma, psoríase ou artrite; e/ou aliviar, em alguma extensão, um ou mais dos sintomas associados com esse distúrbio.

Nos métodos da presente invenção, o termo “controle” e suas variantes gramaticais, são utilizados para se referirem à prevenção, inibição parcial ou completa, redução, atraso ou retardamento de um evento não pretendido, *e. g.* estado fisiológico, tal como a resposta inflamatória associada a um distúrbio tal como asma.

“Tratamento” ou “tratar” referem-se a tratamento terapêutico e a medidas profiláticas ou preventivas. Os que têm necessidade de tratamento incluem os que já têm o distúrbio assim como os propensos a ter o distúrbio ou os em que o distúrbio deva ser prevenido. Para os objectivos desta invenção, os resultados clínicos benéficos ou pretendidos incluem, mas não estão limitados a, alívio de sintomas, diminuição da extensão da doença, estado de doença estabilizado (*i. e.*, a não se agravar), atraso ou retardamento da progressão de doença, melhoria ou palição do estado de doença e remissão (quer parcial quer total) quer seja detectável ou não detectável. “Tratamento” pode também significar prolongar a sobrevivência em comparação com a sobrevivência esperada se não receber o tratamento. Os com necessidade de tratamento incluem os que já têm o estado ou o distúrbio assim como os propensos a ter o estado ou o distúrbio ou os em que se pretende que o estado ou o distúrbio sejam prevenidos.

Um “efeito adverso significativo” sobre o sistema imunitário é um efeito que compromete o sistema imunitário e/ou inibe uma resposta imunitária normal ao desafio com antigénio. Um exemplo de um efeito adverso significativo sobre o sistema imunitário irá ser uma resposta imunitária humoral reduzida.

Os veículos, excipientes ou estabilizantes “farmaceuticamente aceitáveis” são aqueles que são não-tóxicos para a célula ou o mamífero a ser exposto a estes nas dosagens e concentrações utilizadas. Frequentemente o veículo fisiologicamente aceitável é uma solução aquosa com pH tamponado. Os exemplos de veículos fisiologicamente aceitáveis incluem tampões, tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico; polipéptidos

de peso molecular baixo (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes, tal como EDTA; alcoóis de açúcares tais como manitol ou sorbitol; contra-íões formadores de sais tal como sódio; e/ou tensioactivos não-iónicos tais como TWEEN, polietilenoglicol (PEG) e PLURONICS.

Um “lipossoma” é uma pequena vesícula constituída por vários tipos de lípidos, fosfolípidos e/ou tensioactivos que é útil para a distribuição de um fármaco (tal como os anticorpos anti-NGF divulgados aqui e, opcionalmente, um agente quimioterapêutico) a um mamífero. Os componentes do lipossoma são normalmente dispostos numa formação em bicamada, semelhante à organização dos lípidos nas membranas biológicas.

O termo “folheto de embalagem” é utilizado para se referir a instruções normalmente incluídas em embalagens comerciais de produtos terapêuticos, que contêm informação sobre as indicações, utilização, dosagem, administração, contra-indicações e/ou avisos referentes à utilização desses produtos terapêuticos.

“Mamífero” para objectivos de tratamento refere-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e de quinta e animais de jardim zoológico, desporto ou de estimação, tais como cães, cavalos, gatos, vacas, etc. De um modo preferido, o mamífero é humano.

## B. Métodos para realizar a invenção

Como descrito mais detalhadamente abaixo, a administração de anticorpo monoclonal anti-NGF 911 num modelo da asma em murganho reduziu as medidas de hiper-reactividade e inflamação das vias aéreas, mas não reduziu a resposta imunitária humoral ao antigénio inalado como medido pelos níveis totais séricos de imunoglobulina e o nível sérico da IgE.

Os anticorpos anti-NGF são conhecidos na técnica. Os anticorpos anti-NGF úteis na presente invenção incluem anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos, anticorpos bi-específicos, anticorpos heteroconjugados e fragmentos de anticorpos, assim como anticorpos modificados, incluindo variantes de glicosilação de anticorpos, variantes de sequência de aminoácidos de anticorpos e anticorpos modificados covalentemente. Os anticorpos podem ser preparados por qualquer método conhecido na técnica.

Deste modo, os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando o método de hibridoma inicialmente descrito por Kohler *et al.*, *Nature*, **256**:495 (1975) ou por métodos de ADN recombinante (Patente U.S. Nº 4816567).

Resumidamente, no método do hibridoma, é imunizado um murganho ou outro animal hospedeiro adequado, tal como um macaco de cauda de leão ou um hamster, para promover linfócitos que produzem ou têm capacidade de produzir anticorpos que se irão ligar especificamente à proteína utilizada para a imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são então fundidos com células de mieloma



utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103, [Academic Press, 1986]). As células de hibridoma preparadas deste modo são inoculadas e cultivadas num meio de cultura adequado que, de um modo preferido, contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma não fundidas, parentéricas. Por exemplo, se as células de mieloma parentéricas não tiverem a enzima transferase do fosforibosilo de hipoxantina guanina (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura dos hibridomas irá incluir tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), cuja substâncias previnem o crescimento de células deficientes em HGPRT. As linhas celulares de mieloma preferidas são as linhas de mieloma murino, tais como as derivadas dos tumores de murganho MOP-21 e MC.-11 disponíveis de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia EUA e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis da American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EUA. Têm sido também descritas linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma murganho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, **133**:3001 (1984); Brodeur et al., *Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, [1987]). O meio de cultura em que as células de hibridoma estão a crescer é ensaiado para a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antigénio. De um modo preferido, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radio-imunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligada a enzima (ELISA). A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode ser, por exemplo, determinada pela análise Scatchard de

Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, **107**:220 (1980). Após serem identificadas células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou actividade pretendida, as células podem ser subclonadas por processos de diluição limitante e cultivadas por métodos convencionais (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido ascítico ou soro por processos de purificação de imunoglobulina convencionais, tais como, por exemplo, cromatografia de proteína A-Sepharose, hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

A produção recombinante dos anticorpos requer o isolamento de ADN codificando o anticorpo ou cadeias do anticorpo. O ADN codificando os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e sequenciado utilizando processos convencionais (e. g., utilizando sondas oligonucleotídicas que têm capacidade de se ligarem especificamente a genes codificando as cadeias pesadas e leves dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem como fonte preferida desse ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são então transfectados 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 de outra forma não produzem a proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O ADN pode ser também modificado, por exemplo, por substituição da sequência codificante para os domínios constantes da cadeia pesada e leve humana no lugar das sequências murinas homólogas, Morrison, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81, 6851 (1984) ou por ligação covalentemente da totalidade ou parte da sequência

codificante de um polipéptido não-imunoglobulínico à sequência codificando a imunoglobulina. Dessa forma, são preparados anticorpos “quiméricos” ou “híbridos” que tem a especificidade de ligação de um anticorpo monoclonal anti-NGF aqui referido.

Tipicamente, esses polipéptidos não-imunoglobulínicos são substituídos pelos domínios constantes de um anticorpo da invenção ou estes são substituídos pelos domínios variáveis de um local de combinação com o antigénio de um anticorpo da invenção para criar um anticorpo bivalente quimérico compreendendo um local de combinação com o antigénio tendo especificidade para um polipéptido NGF nativo e outro local de combinação com o antigénio tendo especificidade para um alvo diferente, tal como um receptor IgE de afinidade elevada ou um receptor TNF. Podem ser também preparados anticorpos quiméricos ou híbridos *in vitro* utilizando métodos conhecidos na química das proteínas sintéticas, incluindo os que envolvem agentes reticulantes. Por exemplo, podem ser construídas imunotoxinas utilizando uma reacção de permuta de persulfureto ou por formação de uma ligação tioéter. Os exemplos de reagentes adequados para esta finalidade incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato.

Os anticorpos não-humanos, tais como os murinos podem ser humanizados. Geralmente, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos em si, provenientes de uma fonte não-humana. Estes resíduos de aminoácidos não-humanos são frequentemente designados resíduos de “importação”, que são tipicamente obtidos a partir de um domínio variável de “importação”. A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, **321**:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, **332**:323-

327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, **239**:1534-1536 (1988)), substituindo CDR ou sequências de CDR de roedor pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano.

É importante que os anticorpos sejam humanizados com uma retenção de afinidade elevada para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objectivo, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das sequências parentéricas e vários produtos humanizados conceptuais utilizando os modelos tridimensionais das sequências parentéricas e humanizadas. Estão normalmente disponíveis modelos tri-dimensionais de imunoglobulina e são conhecidas dos especialistas na técnica. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e apresentam as estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas seleccionadas. A inspecção destas apresentações permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, *i. e.* a análise dos resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata se ligar ao seu antígeno. Deste modo, podem ser seleccionados e combinados resíduos FR a partir do consenso e sequência de importação de forma que seja obtida a característica de anticorpo pretendida, tal como afinidade aumentada para o(s) antígeno(s) alvo. Em geral, os resíduos CDR estão directamente e, muito substancialmente, envolvidos na influência da ligação ao antígeno. Para detalhes adicionais ver a Patente U.S. N° 5821337.

A invenção inclui também anticorpos anti-NGF humano. Como observado antes, esses anticorpos humanos podem ser preparados pelo método do hibridoma, utilizando linhas celulares de mieloma

humano ou de heteromieloma murganho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos (ver, e. g. Kozbor, *J. Immunol.* **133**, 3001 (1984) e Brodeur, et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, (1987)). Além disso, é possível produzir animais transgênicos (e. g. murganhos) que, após imunização, têm capacidade para produzir um repertório de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a eliminação homozigótica do gene da região de junção da cadeia pesada do anticorpo ( $J_H$ ) em murganhos quiméricos e de mutantes da linha germinal resulta na inibição completa da produção endógena de anticorpo. A transferência da matriz de genes da imunoglobulina da linha germinal humana para esses murganhos mutantes de linha germinal irá resultar na produção de anticorpos humanos após desafio com antígeno. Ver, e. g. Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2551-2555 (1993); Jakobovits et al., *Nature* **362**, 255-258 (1993). Para uma versão melhorada desta tecnologia, ver também Mendez et al. (*Nature Genetics* **15**: 146-156 (1997)).

Alternativamente, pode ser utilizada a tecnologia de apresentação em fagos (McCafferty et al., *Nature* **348**, 552-553 [1990]) para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpo *in vitro*, a partir de repertórios do gene do domínio variável (V) da imunoglobulina provenientes de dadores não imunizados. De acordo com esta técnica, são clonados genes do domínio V anticorpo na grelha de leitura correcta num gene principal da proteína de revestimento ou num secundário de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd e são apresentados como fragmentos de anticorpo funcionais na superfície da partícula fágica. Como a partícula filamentosa contém uma cópia de ADN de cadeia simples do genoma do fago, as selecções

baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo resultam também na selecção do gene codificando o anticorpo apresentando essas propriedades. Deste modo, o fago mimetiza algumas propriedades das células B. A apresentação em fagos pode ser realizada em vários formatos; para a sua revisão ver, e. g. Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* **3**, 564-571 (1993). Podem ser utilizadas várias fontes de segmentos do gene V para a apresentação em fagos. Clackson *et al.*, *Nature* **352**, 624-628 (1991) isolaram uma matriz diversa de anticorpos anti-oxazolona a partir de uma pequena biblioteca combinatória aleatória de genes V derivados dos baços de murganhos imunizados. Pode ser construído um repertório de genes V de dadores humanos não imunizados e podem ser isolados anticorpos contra uma matriz diversa de antigénios (incluindo auto-antigénios) essencialmente seguindo as técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* **222**, 581-597 (1991) ou Griffiths *et al.*, *EMBO J.* **12**, 725-734 (1993). Numa resposta imunitária natural, os genes de anticorpo acumulam mutações numa proporção elevada (hipermutação somática). Algumas modificações introduzidas irão conferir uma afinidade mais elevada e as células B apresentando imunoglobulina de superfície com afinidade elevada são, de um modo preferido, replicadas e diferenciadas durante o desafio com antigénio subsequente. Este processo natural pode ser mimetizado utilizando a técnica conhecida como “embaralhar de cadeias” (Marks *et al.*, *Bio/Technol.* **10**, 779-783 [1992]). Neste método, a afinidade de anticorpos humanos “primários” obtidos pela apresentação em fagos pode ser melhorada por substituição sequencial os genes da região V da cadeia pesada e leve por repertórios de variantes de ocorrência natural (repertórios) de genes do domínio V obtidos a partir de dadores não imunizados. Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpo com afinidades

na gama de nM. Foi descrita uma estratégia para preparar repertórios muito grandes de anticorpos em fagos (também conhecida como “a mãe de todas as bibliotecas”) por Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.* **21**, 2265-2266 (1993) e é descrito o isolamento de um anticorpo humano com afinidade elevada directamente dessa grande biblioteca de fagos por Griffiths *et al.*, *EMBO J.* **13**: 3245-3260 (1994).

O embaralhar de genes pode ser também utilizado para obter anticorpos humanos a partir de anticorpos de roedor, em que o anticorpo humano tem afinidades e especificidades semelhantes em relação ao anticorpo de roedor inicial. De acordo com este método, que é também designado como “memória do epitopo”, o gene de domínio V da cadeia pesada ou leve de anticorpos de roedor, obtido pela técnica de apresentação em fagos é substituído por um repertório de genes do domínio V humano, criando quimeras roedor-humano. A selecção sobre o antigénio resulta no isolamento de domínios variáveis humanos com capacidade de restaurar um local de ligação ao antigénio funcional, *i. e.*, o epitopo controla (memoriza) a selecção do parceiro. Quando o processo é repetido de forma a substituir o restante domínio de V de roedor, é obtido um anticorpo humano (ver o pedido de patente PCT WO 93/06213, publicada a 1 de Abril de 1993). Ao contrário da humanização convencional de anticorpos de roedor por enxerto de CDR, esta técnica proporciona anticorpos completamente humanos, que não têm qualquer estrutura ou resíduos da CDR de origem em roedor.

A presente invenção inclui especificamente anticorpos bi-específicos. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos bi-específicos é baseada na co-expressão de dois pares de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina, em que

duas cadeias pesadas têm especificidades diferentes (Millstein e Cuello, *Nature* **305**, 537-539 (1983)). De acordo com uma abordagem diferente e mais preferida, são fundidos domínios variáveis de anticorpo com a especificidade de ligação pretendida (locais de combinação anticorpo-antigénio) a sequências do domínio constante da imunoglobulina. A fusão é, de um modo preferido, com um domínio constante da cadeia pesada da imunoglobulina, compreendendo, pelo menos, a parte da charneira, regiões CH2 e CH3. É preferido, ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) contendo o local necessário para a ligação da cadeia leve presente em, pelo menos, uma das fusões. São inseridos ADN codificando as fusões da cadeia pesadas da imunoglobulina e, se pretendido, a cadeia leve da imunoglobulina, em vectores de expressão separados e são co-transfectados num organismo hospedeiro adequado. Isto proporciona uma grande flexibilidade no ajustamento das proporções mútuas dos três fragmentos de polipéptido em formas de realização quando proporções desiguais das três cadeias polipeptídicas utilizadas na construção proporcionam os rendimentos óptimos. É, no entanto, possível inserir as sequências codificantes para duas ou três cadeias polipeptídicas num vector de expressão quando a expressão de, pelo menos, duas cadeias polipeptídicas em proporções iguais resulta em rendimentos elevados ou quando as proporções não têm qualquer significado particular. Para detalhes adicionais sobre a produção de anticorpos bi-específicos ver, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* **121**, 210 (1986).

Os anticorpos heteroconjugados estão também dentro do âmbito da presente invenção. Os anticorpos heteroconjugados são compostos por dois anticorpos ligados covalentemente. Esses anticorpos foram, por exemplo, propostos para direccionar



células do sistema imunitárias para células indesejáveis (Patente U.S. Nº 4676980) e para o tratamento da infecção com HIV (publicação de pedido PCT Nº. WO 91/00360 e WO 92/200373; documento EP 03089). Os anticorpos heteroconjugados podem ser preparados utilizando qualquer método de reticulação adequado. São bem conhecidos na técnica agentes de reticulação adequados e são divulgados na Patente U.S. Nº 4676980, juntamente com várias técnicas de reticulação.

Os fragmentos de anticorpo têm sido normalmente obtidos através da digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, e. g., Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Methods* **24**:107-117 (1992) e Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)). No entanto, esses fragmentos podem agora ser produzidos directamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, podem ser recuperados directamente fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli* e serem quimicamente ligados para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter *et al.*, *Bio/Technology*:163-167 (1992)). Numa outra forma de realização, o F(ab')<sub>2</sub> é formado utilizando o fecho de leucina GCN4 para promover a montagem da molécula F(ab')<sub>2</sub>. De acordo com outra abordagem, os fragmentos Fv, Fab ou F(ab')<sub>2</sub> podem ser isolados directamente a partir de uma cultura da células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo irão ser evidentes para os especialistas na técnica.

Pode ser pretendido modificar o fragmento de anticorpo de forma a aumentar a sua meia-vida no soro. Isto pode ser realizado, por exemplo, pela incorporação de um epitopo de ligação ao receptor de salvamento no fragmento de anticorpo (e. g., por mutação da região adequada no fragmento de anticorpo ou por incorporação do epitopo numa marcação peptídica que então

é fundida com o fragmento de anticorpo em qualquer extremidade ou no meio, e. g., por síntese de ADN ou peptídica). Ver documento WO 96/32478 publicado a 17 de Outubro de 1996.

O epitopo de ligação ao receptor de salvamento constitui geralmente uma região em que qualquer um ou mais resíduos de aminoácido de uma ou duas ansas de um domínio Fc são transferidos para uma posição análoga do fragmento de anticorpo. De um modo ainda mais preferido, são transferidos três ou mais resíduos a partir de uma ou duas ansas do domínio Fc. De um modo ainda mais preferido, o epitopo é retirado do domínio CH2 da região Fc (e. g., de uma IgG) e transferido para a região CH1, CH3 ou V<sub>H</sub> ou mais, de uma dessas regiões, do anticorpo. Alternativamente, o epitopo é retirado do domínio CH2 da região Fc e é transferido para a região C<sub>L</sub> ou para a região V<sub>L</sub> ou para ambas, do fragmento de anticorpo.

São preparadas variantes de sequência de aminoácido, incluindo variantes de substituição, inserção e/ou eliminação, dos anticorpos anti-NGF especificamente divulgados, introduzindo modificações de nucleótido adequadas no ADN codificante ou por síntese peptídica. Os métodos para preparar essas variantes são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, "mutagénese de rastreio de alanina", como descrito por Cunningham e Wells *Science*, **244**:1081-1085 (1989). Um tipo particular de variante de aminoácido de um anticorpo altera o padrão original de glicosilação do anticorpo. Por alteração pretende-se significar eliminar uma ou mais unidades hidrato de carbono encontradas no anticorpo e/ou adicionar um ou mais locais de glicosilação que não estão presentes no anticorpo.

### *Rastreo de anticorpos com as propriedades pretendidas*

Os anticorpos úteis são aqueles que neutralizam a actividade do NGF. Deste modo, por exemplo, os anticorpos anti-NGF neutralizantes da presente invenção podem ser identificados por incubação de um anticorpo candidato com NGF e por monitorização da ligação e da neutralização de uma actividade biológica do NGF. O ensaio de ligação pode ser realizado com o(s) polipéptido(s) NGF purificado(s) ou com células expressando naturalmente ou transfectadas para expressar, polipéptido(s) NGF. Numa forma de realização, o ensaio de ligação é um ensaio de ligação competitivo, em que é avaliada a capacidade de um anticorpo candidato para competir com um anticorpo anti-NGF conhecido para a ligação a NGF. O ensaio pode ser realizado em vários formatos, incluindo o formato ELISA.

A capacidade de um anticorpo candidato para neutralizar uma actividade biológica do NGF pode ser, por exemplo, realizada por monitorização da capacidade do anticorpo candidato para inibir a sobrevivência mediada por NGF no bioensaio de sobrevivência de gânglios da raiz dorsal em rato embrionário como descrito em Hongo *et al.* (*Hibridoma* **19**:215-227 (2000)).

Pode ser realizado um ensaio de bloqueamento cruzado de rotina, tal como o descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988), para rastrear anticorpos que se ligam a um epitopo em NGF ligado a um anticorpo de interesse. Alternativamente ou adicionalmente, o mapeamento do epitopo pode ser realizado por métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o epitopo NGF ligado a um anticorpo monoclonal da presente invenção pode ser determinado

por análise de ligação competitiva como descrito em Fendly *et al.* *Cancer Research* **50**:1550-1558 (1990). Podem ser feitos estudos de bloqueamento cruzado por fluorescência directa em células intactas utilizando uma máquina de rastreio PANDEX™ Screen Machine para quantificar a fluorescência. Neste método o anticorpo monoclonal é conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), utilizando processos estabelecidos (Wofsy *et al.* *Selected Methods in Cellular Immunology*, p. 287, Mishel e Schiigi (ed.) San Francisco: W. J. Freeman Co (1980)). São adicionadas células expressando NGF em suspensão e anticorpos monoclonais purificados a poços da placa PANDEX™ são incubados e a fluorescência é quantificada por PANDEX™. Considera-se que os anticorpos monoclonais partilhem um epitopo se cada um bloquear a ligação do outro em 50% ou mais, em comparação com um anticorpo monoclonal de controlo irrelevante.

Podem ser também identificados anticorpos anti-NGF úteis na presente invenção utilizando bibliotecas combinatórias para rastrear clones de anticorpo sintéticos com a actividade ou as actividades pretendidas. Esses métodos são bem conhecidos na técnica. Resumidamente, são seleccionados clones de anticorpos sintéticos por rastreio de bibliotecas de fagos contendo fagos apresentando vários fragmentos (e. g. Fab, F(ab')<sub>2</sub>, etc...) da região de variável (Fv) do anticorpo fundidos com proteínas do revestimento do fago. Essas bibliotecas de fago são rastreadas por cromatografia de afinidade contra o antigénio pretendido. Os clones expressando fragmentos Fv com capacidade de ligação ao antigénio pretendido são adsorvidos ao antigénio e deste modo separados dos clones não ligantes na biblioteca. Os clones ligantes são então eluídos do antigénio e podem ainda ser enriquecidos por ciclos adicionais de adsorção/eluição do antigénio. Podem ser obtidos anticorpos anti-NGF adequados para

utilização na presente invenção concebendo um processo de rastreio de antigénio adequado para seleccionar para o clone de fago de interesse, seguido pela construção de um clone de anticorpo anti-NGF completo utilizando as sequências Fv do clone de fago de interesse e uma sequência da região constante (Fc) adequada.

Os resultados obtidos nos ensaios biológicos com base celular podem ser seguidos por testes em modelos animais, e. g. modelos murinos e ensaios clínicos humanos. Se pretendido, os anticorpos monoclonais murinos identificados como tendo as propriedades pretendidas podem ser convertidos em anticorpos quiméricos ou humanizados por técnicas bem conhecidas na técnica, incluindo a estratégia de “mutagénese de conversão génica”, como descrito na Patente U.S. Nº 5821337.

### C. Formulações Farmacêuticas

São preparadas formulações terapêuticas do anticorpo utilizado de acordo com a presente invenção para armazenamento misturando um anticorpo tendo o grau de pureza pretendido com veículos excipientes ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis opcionais (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os 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; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio, cloreto

de benzetónio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquilparabenos tais como metil ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do soro, 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, tal como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íões formadores de sais, tal como sódio; complexos metálicos (e. g. complexos Zn-proteína); e/ou tensioactivos não-iónicos, tais como TWEEN, PLURONICS ou polietilenoglicol (PEG).

Os anticorpos anti-NGF neutralizantes úteis nos métodos da presente invenção também ser podem formulados como imunolipossomas. São preparados lipossomas contendo o anticorpo por métodos conhecidos na técnica, tais como descritos em Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:4030 (1980); e Pat. U. S. N° 4485045 e 4544545. Na Patente U.S. N° 5013556 são divulgados lipossomas com tempo de circulação melhorado.

Podem ser produzidos lipossomas particularmente úteis pelo método de evaporação de fase invertida com uma composição lipídica compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada com PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudidos através de filtros com tamanho de poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro pretendido. Os fragmentos Fab' do anticorpo da presente invenção podem ser conjugadas com os lipossomas como descrito em Martin *et al.*, *J.*

*Biol. Chem.* **257**:286-288 (1982) através de uma reacção de permuta de persulfureto. É opcionalmente contido dentro do lipossoma um agente quimioterapêutico (tal como Doxorubicina). Ver Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.* **81**(19):1484 (1989).

Podem ser também aprisionados ingredientes activos em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, respectivamente, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacilato), em sistemas de distribuição de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Essas técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980).

Podem ser preparadas preparações de libertação sustida. Os exemplos adequados de preparações de libertação sustida incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, em que as matrizes estão na forma de artigos conformados, e. g. películas ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de libertação prolongada incluem poliéster, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) ou poli(vinilálcool)), polilactidos (Pat. U.S. Nº 3773919), co-polímeros do ácido L-glutâmico e etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo não-degradável, co-polímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tais como LUPRON DEPOT (microesferas injectáveis constituídas por co-polímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolido) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

A formulação aqui pode também conter mais de um composto activo quando necessário para a indicação particular a ser tratada, de um modo preferido, compostos com actividades complementares que não se afectem adversamente entre si. Por exemplo, pode ser pretendido proporcionar ainda em formulação anticorpos que se ligam a um epitopo do NGF ou a um receptor NGF diferente. Alternativamente ou adicionalmente, a composição pode compreender ainda outro composto biologicamente activo, tal como um agente anti-inflamatório. Essas moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para a finalidade pretendida.

As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente obtido, por exemplo, por filtração através de membranas de filtração estéril.

As composições terapêuticas de anticorpo anti-NGF são geralmente colocadas num recipiente tendo uma entrada de acesso estéril, por exemplo, um saco para solução intravenosa ou um frasco tendo uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

#### D. Tratamento com anticorpos anti-NGF

É contemplado que, de acordo com a presente invenção, o anti-NGF como definido nos anticorpos das reivindicações pode ser utilizado para tratar a dor crónica como definido nas reivindicações. Os anticorpos anti-NGF podem ser utilizados para prevenir o estabelecimento do estado de doença activo, para tratar sintomas que estão a ser sentidos no momento e para tratar a própria doença subjacente.



Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que controlam as respostas alérgicas e terapia melhoradas, a incidência de doenças alérgicas, especialmente da asma, aumentou dramaticamente nos últimos anos (Beasley *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol* **105**:466-472 (2000); Peat e Li, *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**:1-10 (1999)). As doenças alérgicas podem ser tratadas, por exemplo, por vacinação à base de alergénio, em que são administradas doses crescentes do alergénio por injeção ao longo de anos. A asma ligeira pode ser normalmente controlada na maior parte dos doentes com doses relativamente baixas de corticosteróides inalados, enquanto a asma moderada é normalmente controlada por administração adicional de antagonistas  $\beta$  de actuação prolongada inalados ou inibidores do leucotrieno. No entanto, o tratamento da asma grave é ainda um problema médico sério. Embora um anticorpo anti-IgE que actualmente aguarda aprovação da FDA (rhuMAb-E25, Xolair™, desenvolvido em colaboração entre Genentech, Inc., Tanox, Inc. e Novartis Pharmaceuticals Corporation) mostre resultados promissores na intervenção precoce no tratamento de estados que originam os sintomas da asma alérgica e da rinite alérgica sazonal, existe uma necessidade de desenvolvimento de estratégias e agentes terapêuticos adicionais para controlar doenças alérgicas, tais como a asma.

Os anticorpos anti-NGF são também úteis no controlo de outros estados inflamatórios, tais como esclerose múltipla, colite, doença inflamatória do intestino, cistite da bexiga, eczema, dermatite de contacto, artrite, incluindo artrite crónica e artrite reumatóide, doença de Crohn e psoríase.

Além disso, anticorpos anti-NGF são também úteis no tratamento de outras doenças que podem estar associadas com

níveis aumentados do NGF incluindo, por exemplo, lúpus eritematoso, zona, neuralgia pós-herpética, hiperalgesia e dor crónica.

Os anticorpos anti-NGF são administrados a um mamífero, de um modo preferido, a um doente humano, de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa, *e. g.*, como um bolus ou por infusão contínua ao longo de um período de tempo, pelas vias intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral ou tópica. O anticorpo anti-NGF pode ser também administrado por inalação. Nebulizadores comercialmente disponíveis para formulações líquidas, incluindo nebulizadores de jacto e nebulizadores ultrasónicos são úteis para a administração. As formulações líquidas podem ser nebulizadas directamente e o pó liofilizado pode ser nebulizado após reconstituição. Alternativamente, anticorpo anti-NGF pode ser aerossolizado utilizando uma formulação de fluorcarboneto e um inalador de dose medida ou inalado como um liofilizado e pó moído. Para o tratamento da asma e de outros estados caracterizados pela hiper-reatividade das vias aérea, uma via preferida da administração é por inalação.

Podem ser combinados outros regimes terapêuticos com a administração do anticorpo anti-NGF. A administração combinada inclui a co-administração, utilizando formulações separadas ou uma formulação farmacêutica única e a administração consecutiva, em qualquer ordem, em que, de um modo preferido, existe um período de tempo em que ambos (ou todos) os agentes activos exercem simultaneamente as suas actividades biológicas. Para o tratamento da asma, poderá ser particularmente vantajoso utilizar os anticorpos aqui referidos em combinação com

anticorpos anti-IgE, em particular rhuMAb-E25 (Xolair™) ou com a molécula de anticorpo de segunda geração rhuMAb-E26 (Genentech, Inc.). O anticorpo rhuMAb-E25 é um anticorpo monoclonal anti-IgE humanizado recombinante que foi desenvolvido para interferir precocemente no processo alérgico. A utilização combinada inclui também a possibilidade de administrar os dois anticorpos numa única formulação farmacêutica ou utilizar um anticorpo bi-específico, com especificidades anti-NGF e anti-IgE. Numa outra forma de realização preferida, os anticorpos anti-NGF aqui referidos são administrados em combinação com corticosteróides inalados, tal como tratamento com dipropionato de beclometasona (BDP). Para o tratamento da artrite reumatóide ou da doença de Crohn, os anticorpos da presente invenção podem ser administrados em combinação com outros regimes de tratamento conhecidos para o tratamento destas doenças. Por exemplo, os anticorpos anti-NGF aqui referidos podem ser administrados em combinação com Remicade® (Infliximab, Centocor) ou Enbrel® (Etanercept, Wyet-Ayerst). A presente invenção inclui também anticorpos bi-específicos que visam estas doenças. Por exemplo, um anticorpo bi-específico pode incluir uma especificidade anti-TNF combinada com a capacidade de ligação a NGF dos anticorpos aqui referidos.

As dosagens adequadas para qualquer dos agentes co-administrados acima são as presentemente utilizadas e podem ser baixadas devido à acção combinada (sinergia) do agente e do anticorpo anti-NGF.

Para a prevenção ou tratamento da doença, a dosagem adequada do anticorpo anti-NGF irá depender do anticorpo anti-NGF utilizado, do tipo de doença a ser tratada, da gravidade e desenvolvimento da doença, se o anticorpo é

administrado para finalidades preventivas ou terapêuticas, terapia prévia, história clínica do doente e resposta ao anticorpo e da descrição do médico assistente. Tipicamente o clínico irá administrar o anticorpo anti-NGF até que seja obtida uma dosagem que atinja o resultado pretendido.

O anticorpo anti-NGF é administrado adequadamente ao doente uma vez ou ao longo de uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e da gravidade da doença, cerca de 2 mg/kg de anticorpo são uma dosagem candidata inicial para administração ao doente, quer, por exemplo, através de uma ou mais administrações separadas ou por dosagem contínua ou repetida. Uma dosagem diária típica poderá variar entre cerca de 1 g/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos factores referidos acima. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais prolongadas, dependendo do estado, o tratamento é prolongado até que ocorra uma supressão pretendida de sintomas da doença. Um regime de dosagem preferido, compreende a administração de 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. No entanto, podem ser úteis outros regimes de dosagem, dependendo do padrão de decaimento farmacocinético que o médico pretenda obter. O progresso desta terapia é facilmente monitorizado por técnicas e ensaios convencionais.

#### E. Artigos de Produção

Numa outra forma de realização da invenção, é proporcionado um artigo de produção como definido nas reivindicações, contendo materiais úteis para o tratamento dos distúrbios descritos acima. O artigo de produção compreende um recipiente e um rótulo

ou folheto(s) de embalagem no recipiente ou associados a este. Os recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, etc. Os recipientes podem ser constituídos por vários materiais, tais como vidro ou plástico. O recipiente contém que uma composição que é eficaz no tratamento do estado e pode ter uma entrada de acesso estéril (por exemplo o recipiente pode ser um saco para solução intravenosa ou um frasco tendo uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). Pelo menos, um agente activo na composição é um anticorpo anti-NGF. O recipiente pode ainda compreender um segundo agente farmacologicamente activo. De um modo preferido, o segundo agente é adequado para o tratamento de uma doença inflamatória, tal como a asma, esclerose múltipla, artrite, lúpus eritematoso e a psoríase.

O rótulo ou o folheto da embalagem indicam que a composição é utilizada para tratar o estado de eleição, tal como um estado inflamatório. Numa forma de realização, o rótulo ou o folheto da embalagem indicam que a composição compreendendo o anticorpo que se liga a NGF pode ser utilizada para tratar um estado inflamatório seleccionado do grupo consistindo de asma, esclerose múltipla, artrite, lúpus eritematoso e psoríase. Além disso, o rótulo ou o folheto da embalagem podem indicar que o doente a ser tratado é um que tenha asma, psoríase, artrite ou outra doença ou distúrbio. Além disso, o artigo de produção pode compreender (a) um primeiro recipiente com uma composição aí contida, em que a composição compreende um primeiro anticorpo que se liga a NGF e inibe a sua actividade biológica; e (b) um segundo recipiente com uma composição aí contida, em que a composição compreende um segundo anticorpo que se liga a um receptor NGF e bloqueia a activação do ligando. O artigo de produção pode compreender ainda um folheto de embalagem que

indica que as primeiras e segundas composições podem ser utilizadas para tratar asma, psoríase, artrite ou outra doença ou distúrbio. Alternativamente ou adicionalmente, o artigo de produção pode compreender, ainda um segundo (ou terceiro) recipiente compreendendo um tampão farmacologicamente aceitável, tal como água bacteriostática para injeção (BWHI), soro fisiológico tamponado com fosfato, solução de Ringer ou solução de dextrose. Este pode incluir, ainda, outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

Nos exemplos não-limitantes seguintes são ilustrados detalhes adicionais da invenção.

#### EXEMPLOS

Foram utilizados reagentes disponíveis comercialmente referidos nos exemplos de acordo com instruções do fabricante a menos que indicado de outra forma. A fonte das células identificada nos exemplos seguintes e ao longo da descrição, pelos números de acesso ATCC é a American Type Culture Collection, Manassas, VA.

## EXEMPLO 1

### Produção e Caracterização de Anticorpos Monoclonais Anti-NGF

#### *A. Produção de anticorpos Monoclonais anti-NGF*

Este exemplo ilustra a preparação de anticorpos monoclonais que se podem ligar especificamente à NGF humana (hNGF). As técnicas para produzir anticorpos monoclonais são bem conhecidas na técnica e são descritas, por exemplo, em Kohler e Milstein, *Nature* **256**:495-497 (1975). As experiências descritas nos Exemplos 1 e 2 são descritas adicionalmente em Hongo *et al.*, *Hibridoma* **19**:215-227.

Foi desenvolvido Um painel de 23 anticorpos monoclonais de murinos contra hNGF por um método análogo ao descrito em Hongo *et al.*, *Hibridoma* **14**:253-260. Resumidamente, foram imunizados murganhos de Balb/c (Charles River Laboratories, Wilmington, DE) com NGF humano em adjuvante Ribi (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO). Foram fundidos esplenócitos de murganho apresentando o título de anticorpo mais elevado contra NGF imobilizado com células de mieloma de murganho (X63. Ag8.653; American Type Culture Collection, Rockville, MD). Após 10-14 dias, os sobrenadantes foram recolhidos e rastreados para a produção de anticorpo por ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA). Os clones apresentando a imunoreactividade mais elevada após o gundo ciclo de clonagem foram injectados em murganhos preparados com Pristano (Hoogenraad *et al.*, *J. Immunol Methods* **6**:317-320 (1983)) para a produção de MAb *in vivo*. Os fluidos ascíticos foram reunidos e purificados por cromatografia de afinidade (cromatografia líquida rápida de proteína de

Pharmacia; Pharmacia, Upsala, Suécia) utilizando um processo estabelecido (Moks *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **85**:1205-1210 (1986)) em proteína A de *Staphylococcus* (Pharmacia). As preparações de anticorpo purificadas foram esterilizadas por filtração e armazenadas a 4 °C em meio fisiológico tamponado com fosfato (PBS).

#### *B. Mapeamento de Epitopos Utilizando Mutantes de Permuta de Domínio*

Foi inicialmente determinada a especificidade de epitopo de MAb anti-NGF por avaliação da ligação dos MAb a proteínas NGF/neurotrofina-3 (NT-3) quiméricas produzidas por mutagênese de rastreamento homólogos. A utilização desses mutantes de permuta de domínio tem uma vantagem distinta em relação a mutantes de eliminação. A eliminação de um domínio poderá interromper a estrutura secundária da proteína enquanto a substituição de um domínio por um domínio correspondente, de tamanho semelhante e sequência de aminoácidos substancialmente semelhante, de uma proteína relacionada em mutantes de permuta de domínio irá provavelmente conservar a estrutura secundária.

Foram produzidos oito mutantes quiméricos hNGF/hNT-3, contendo três a sete substituições de resíduos da sequência da NT-3 (hNT-3) humana nas regiões variáveis correspondentes do hNGF (Figura 1) por mutagênese dirigida por oligonucleótidos. Os mutantes quiméricos foram expressos transientemente em células 293 humanas e foi avaliada a ligação de MAb anti-hNGF a NGF mutantes por ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), como descrito abaixo, utilizando o MAb purificado como o anticorpo de captura e o anticorpo policlonal anti-hNGF de



coelho purificado por afinidade conjugado com HRP para a detecção. Foi determinada a ligação de MAb anti-hNGF a cada mutante NGF a partir de duas a quatro análises ELISA quantitativas independentes e foi comparada com a ligação a NGF de tipo selvagem.

Resumidamente, foram revestidas placas de microtitulação (Nunc Maxisorb, VWR Scientific, San Francisco, CA) com 100 µL por poço de IgG de cabra anti-murganho 1 µg/mL (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) durante a noite a 4 °C, lavadas e o excesso de locais ligações z foi bloqueado com PBS contendo 0,0596 de Tween 20 com 0,596 de albumina de soro bovino (BSA, Intergen, San Diego, CA; PBS/BSA/T20). Foram adicionados MAb (diluídos a 1 µg/mL em PBS/BSA/T20) aos poços adequados e incubados durante 1-2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e foram adicionados 100 µL de hNGF de tipo selvagem ou mutante (diluído em PBS/BSA/T20 a 60 ng/mL → 7,8 ng/mL), incubados durante 1-2 horas à temperatura ambiente e lavados novamente. Foi adicionado anticorpo policlonal de coelho anti-hNGF purificado conjugado com peroxidase de rábano (HRP; 1:10000 em PBS/BSA/T20) 100 µL por poço e incubado durante 1 hora. As placas foram reveladas e lidas em comprimento de onda duplo. Foi comparada a ligação dos MAb aos mutantes hNGF com a ligação ao hNGF de tipo selvagem (estabelecido como 100%) analisado nas mesmas condições.

Foram seleccionados seis anticorpos monoclonais anti-NGF humano (MAb 908, 909, 911, 912, 938 e 14.14) que apresentam afinidades elevadas para hNGF ( $EC_{50}$  = 0,18 nM para MAb 908, 0,18 nM para MAb 909, 0,37 nM para MAb 911, 0,18 para MAb 912, 0,74 para MAb 938 e 0,59 para MAb 14.14) e uma redução superior a 60-90% para a ligação a vários mutantes quiméricos (Figura 1)

para análise adicional. Como mostrado na Figura 1, três dos MAb (908, 909 e 14.14) apresentam uma especificidade de ligação regional evidente, caracterizada por perda de 60-95% da ligação máxima a uma região variável única (Figura 1). Foram observados efeitos menos pronunciados de mutantes de região variável para MAb 911, 912 e 938, com regiões NGF variáveis múltiplas contribuindo para os epitopos ligantes destes anticorpos. No entanto, as regiões variáveis que compreendem estes epitopos estão em grande proximidade dentro da estrutura tridimensional (Figura 3A).

#### *C. Mapeamento de Epitopos Utilizando Mutagênese Dirigida para um Local*

Para definir ainda a especificidade de epitopo de cada um dos seis MAb anti-NGF selecionados, foram produzidos, expressos e caracterizados mutantes de NGF representando mutações pontuais de aminoácido simples, duplas ou triplas, com um foco particular em resíduos dentro de regiões anteriormente descritas como desempenhando um papel na ligação e função biológica de TrkA e p75 (Shih et al., *J. Biol Chem.*, **269**(44):27679-27686 (1994)). Os efeitos das mutações sobre a ligação de MAb anti-NGF foram caracterizados por ELISA como descrito acima. Os valores de EC<sub>50</sub> médios para ligação de MAb anti-NGF a cada mutante foram calculados a partir de curvas de ligação em ELISA e comparados com valores de EC<sub>50</sub> obtidos para a ligação de NGF de tipo selvagem (Figura 2A-F).

Para a totalidade dos seis MAb, a especificidade de ligação dos mutantes pontuais hNGF correlacionou-se geralmente com as regiões anteriormente identificadas por perda de ligação a

mutantes quiméricos NGF específicos. No entanto, os efeitos das mutações pontuais de NGF na ligação dos MAb 911 e 938 foram menos proeminentes em relação aos efeitos observados nos outros MAb (Figura 2A-F). A especificidade regional dos efeitos mutacionais correlacionou-se com resíduos dentro ou próximos de regiões variáveis permutadas nos mutantes quiméricos NGF e que resultaram na perda de mais de 50-60% da ligação máximo dos MAb 911 ou 938. Para o MAb 911, estas mutações incluíram K32A+K34A+E35A, Y79A+T81K, H84A+K88A e R103A. Foi observada perda de ligação adicional com as mutações próximas E11A, Y52A e L112A+S113A (Figura 2C). Isto indica que o epitopo para o MAb 911 abrange quatro de sete regiões variáveis de hNGF (Fig. 3C).

#### *D. Dependência Estrutural de Epitopos de Ligação longínqua por MAb*

Foi avaliada a ligação de MAb anti-NGF a formas não-reduzidas e reduzidas de hNGF para determinar se ligação de MAb anti-NGF a hNGF depende da conformação estrutural de epitopos em hNGF. O hNGF, não tratado ou reduzido por tratamento com mercaptoetanol, foi submetido a electroforese em gel e transferido para membranas de nitrocelulose para imunotransferência. Para a detecção de hNGF, as membranas de nitrocelulose foram lavadas, incubadas com anticorpos primários e secundários, expostas ao substrato luminol (Amersham International, Amersham, R.U.) durante 1 minuto à temperatura ambiente com agitação e expostas película de raios x (Eastman Kodak, Rochester, NI) durante 10-45 segundos. Na Figura 4 pode ser observada que vários anticorpos monoclonais anti-NGF apresentam uma ligação mínima a formas reduzidas de hNGF. Estes incluem MAb 938, 908, 911 e 912, indicando que os epitopos no

hNGF a que estes se ligam são afectados estruturalmente por alteração de carga e redução.

#### E. Modelação molecular de epitopos em anticorpos monoclonais anti-NGF

Foram produzidas representações de modelação molecular de epitopos dos MAb anti-NGF identificados (Figura 3A-F) utilizando o programa MidasPlus (University of California em San Francisco, San Francisco, CA) e foram baseadas em coordenadas para a estrutura tridimensional de NGF murino como anteriormente descrito (McDonald e em., *Nature*, **354**:411-414 (1991)).

Na Figura 5 é apresentado um resumo dos resultados do mapeamento do epitopo de MAb.

#### EXEMPLO 2

#### Determinação da Actividade Neutralizante de Anticorpos Monoclonais Anti-NGF

A observação de que alguns epitopos mapeados em regiões que revelaram anteriormente serem significativas na interacção de NGF com TrkA e/ou p75 sugeriu que os MAb correspondentes pudessem também bloquear uma ou ambas estas interacções.

#### A. Ensaio de Ligação a $^{125}\text{I}$ -hNGF.

Foi medida a ligação de  $^{125}\text{I}$ -hNGF à imuno-adesina receptora TrkA-IgG na presença de anticorpos monoclonais anti-NGF para avaliar a possibilidade de um ou mais dos MAb anti-NGF poderem bloquear a ligação de NGF a TrkA e/ou p75.

Resumidamente, foi preparado  $^{125}\text{I}$ -hNGF utilizando uma modificação do método da lactoperoxidase solúvel originalmente descrito por Marchalonis (Marchalonis, *Biochem J.*, **113**:299-305 (1969)). A mistura de reacção final foi fraccionada numa coluna de exclusão de tamanho pD-10 Sephadex G-25 (Pharmacia, Upsala, Suécia) e armazenada a 4 °C. Foram revestidas placas de microtitulação (Nunc, Maxisorb) durante a noite a 4 °C com o anticorpo policlonal de coelho anti-IgG humana específico para Fc purificado (diluído a 2 µg/mL em tampão carbonato), lavado com PBS e bloqueado com 150 µL de PBS/BSA a 0,5% (PBS/BSA). Foram adicionados imuno-adesinas TrkA-IgG ou p75-IgG humanas (gentilmente cedidas por Robert Pitti) (20 ng/mL) em PBS/BSA (100 µL) e incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora. Foi então adicionado hNGF diluído em PBS/BSA (150 pM final) (100 µL) e incubado durante 1 hora à temperatura ambiente. Foi adicionado paralelamente hNGF (150 pM final) pré-incubado durante a noite a 4 °C, com anticorpos monoclonais anti-NGF (667 nM → 0,58 nM) ou um anticorpo monoclonal irrelevante não direccionado para NGF e foi incubado como descrito. As placas foram lavadas com PBS contendo T20 a 0,05% e os poços individuais foram contados durante 1 minuto num contador gama (Packard Cobra Model 5010, Downers Grove, IL).

Como pode ser verificado na Figura 6, os anticorpos monoclonais anti-NGF inibiram ligação de hNGF à imuno-adesina

receptora TrkA-IgG como medido pelo nível de hNGF marcado com  $^{125}\text{I}$  ligado a TrkA-IgG. A totalidade dos MAb apresentou capacidade de bloqueamento na concentração mais elevada ensaiada (667 nM), mas apresentou claramente diferentes capacidades de bloqueamento em concentrações mais baixas. Os MAb 911, 912 e 938 apresentaram a mesma potência de bloqueamento ( $\text{IC}_{50} \sim 0,5\text{-}2$  nM), com uma inibição a 80-90% verificada a MAb 10 nM ou superior.

Foi avaliada a capacidade dos MAb para inibirem a ligação de hNGF ao receptor p75 de baixa afinidade utilizando p75-IgG no ensaio de ligação descrito acima. Como mostrado na Figura 7, os anti-hNGF inibiram a ligação de MAb de hNGF à imuno-adesina receptora p75-IgG utilizando hNGF marcado com  $^{125}\text{I}$ . Os MAb 911, 912 e 938 apresentaram a actividade inibidora mais elevada com uma redução na ligação de 75-90% observada na presença de de MAb a menos 1 nM. O MAb 909 também apresentou capacidade de bloqueamento potente (inibição > 90% com MAb 10 nM), enquanto os MAb 908 e 14.14 foram significativamente menos potentes (Figura 7).

#### B. Ensaio de activação do receptor induzida por cinase (KIRA).

Foi utilizada um de ensaio activação de receptor induzida por cinase (KIRA) para medir a autofosforilação de TrkA NGF dependente de em células transfectadas em resposta ao estímulo com um ligando, tal como hNGF e/ou anticorpos monoclonais agonistas (Sadick et al., *Exp. Cell Res.* **234**:354-361 (1997)). Foram avaliados os MAb anti.NGF para a sua capacidade para inibir a ligação de hNGF ao domínio extracelular TrkA expresso em células CHO transfectadas e fosforilação subsequente dos

resíduos de tirosina em TrkA (Figura 8). A fosforilação dos resíduos de tirosina foi medida por ELISA utilizando MAb anti-fosfotirosina.

Foram revestidas placas de microtitulação (Costar, Cambridge, MA) com  $1 \times 10^5$  células de ovário de hamster chinês (CHO) expressando o domínio extracelular do receptor TrkA com um fragmento da glicoproteína D do vírus Herpes simplex (gD), um polipéptido com 26 aminoácidos que serve como uma marcação de epitopo. Foram então adicionadas amostras de hNGF apenas (150 pM) (como um controlo positivo) ou hNGF (150 pM final) pré-incubado durante a noite a 4 °C, com os MAb anti-NGF individuais (667nM → 0,31 nM final) a poços contendo as células CHO expressando TrkA (50 µL por poço) e incubadas a 37 °C durante 25 minutos. Foi utilizado um anticorpo monoclonal irrelevante não dirigido contra NGF como um controlo negativo. As células estimuladas com hNGF foram então tratadas com tampão de lise e os lisados foram processados em placas de microtitulação revestidos com gD-MAb para detecção por ELISA de fosfotirosina contendo TrkA semelhante ao processo descrito por Sadick et al. (Sadick et al., *Anal. Biochem.*, **235**:207,214 (1996)). Foram adicionados a cada poço 100 µL de 4G10 biotinilado (monoclonal anti-fosfotirosina de Upstate Biologicals, Inc. (UBI, Lake Placid, NI)) diluído a 0,2 mg/mL em tampão de diluição (PBS contendo BSA a 0,5%, Tween a 0,05% EDTA 20,5 mM e timerosol a 0,01%). Após incubação durante 2 horas à temperatura ambiente a placa foi lavada e foram adicionados 100 µL de estreptavidina conjugada com HRP (Zymed Laboratories, S. San Francisco, CA) diluído 1:50000 em tampão de diluição a cada poço. A placa foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente com a agitação suave. O conjugado de avidina livre foi removido por lavagem e foram adicionados 100 µL de solução de

substrato preparada recentemente (tetrametil benzidina, TMB, kit de substrato de dois componentes, Kirkegard and Perry, Gaithersburg, MD) a cada poço. Foi permitido que a reacção prosseguisse durante 10 minutos, após o que a revelação da coloração foi terminada pela adição de 100 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 M/poço. A absorvência em 450 nm foi lida a um comprimento de onda de referência de 650 nm ( $A_{450/650}$ ), utilizando um leitor de placas Vmax (Molecular Devices, Palo Alto, CA) controlado com um Macintosh Centris 650 (Apple Computers, Cupertino, CA) e programa informático DeltaSoft (BioMetallics, Inc., Princeton, NJ).

Como mostrado na Figura 8, todos os anticorpos monoclonais anti-NGF seleccionados podem inibir tanto a ligação de hNGF ao domínio extracelular de TrkA expresso em células CHO transfectadas como a fosforilação de resíduos de tirosina do receptor TrkA. A pré-incubação de hNGF com os MAb 911, 912 e 938 na concentração mais baixa testada (0,3 nM) resultou na inibição máxima de aproximadamente 60-80% da fosforilação da tirosina em relação ao MAb de controlo. Os MAb 908, 909 e 14.14 foram menos potentes.

#### *C. Bioensaio de sobrevivência de gânglio da raiz dorsal de rato embrionário.*

Outro ensaio utilizado para determinar os efeitos de anticorpos monoclonais anti-NGF em processos dependentes de NGF consistiu no bioensaio de sobrevivência de gânglios da raiz dorsal (DRG) de rato embrionário E14. Foram avaliados anticorpos monoclonais anti-NGF para a sua capacidade para inibir os



efeitos de sobrevivência de hNGF sobre os neurónios de gânglios da raiz dorsal (DRG) de ratos embrionários E14 (Figura 9).

Foram cultivados neurónios de gânglios da raiz dorsal (DRG) obtidos de ratos E15 (seis a oito embriões) em meio F12 com aditivos (McMahon *et al.*, *Nat. Med.* **8**:774-780 (1995)) e hNGF 3 ng/mL com ou sem anticorpos monoclonais anti-NGF. Após 72 horas da incubação a 37 °C, as células foram fixas com formaldeído e foram contados os neurónios viáveis.

A figura 9 mostra a inibição da sobrevivência neuronal de DRG por anticorpos monoclonais anti-NGF. Enquanto os MAb 908, 909 e 14.14 reduziram a sobrevivência em apenas 20-30% na concentração mais elevada (67 nM; 10 µg/mL), os MAb 911 e 912 inibiram a sobrevivência a mais de 90% em concentrações aproximadamente 30-80 vezes mais baixas (0,8-2,4 nM; 0,12-0,37 µg/mL). O MAb 938 foi capaz de inibir a actividade de sobrevivência em 90%, mas foi 10-30 vezes menos potente do que os MAb 911 e 912.

O MAb 911 foi o bloqueador mais potente da interacção NGF/TrkA. O MAb 911 reconhece um epitopo contendo a região de ligação de NGF a TrkA e p75 sobreposta enrolamento  $\beta$  A'-A'' (V-1) e a região de ligação a TrkA dominante na folha  $\beta$  (Figura 3C). O segundo inibidor NGF/TrkA mais forte, o MAb 912, reconhece os resíduos K32, K34 e E35 uma região que revelou anteriormente ser crucial para a interacção NGF/p75. O MAb 938, outro bloqueador potente da ligação a TrkA e p75 reconhece também regiões fundamentais para a ligação a TrkA ou p75, os terminais N e C.

As diferenças observadas na especificidade de bloqueamento do anticorpo não são devidas às afinidades relativas dos MAb para o hNGF dado que dois dos três anticorpos de bloqueamento mais potentes (911 e 938) têm afinidades mais baixas para o NGF do que os MAb bloqueadores mais fracos.

As regiões do NGF fundamentais para a ligação aos MAb 911 e 912 sobrepõem-se a regiões identificadas como regiões fundamentais para a ligação a TrkA e p75. Os MAb 911 e 912 são bloqueadores competentes de actividades induzidas pelo NGF, indicando que estes seriam antagonistas específicos de actividades *in vivo* tal como hiperalgesia inflamatória.

### EXEMPLO 3

#### O Efeito de anti-NGF na Resposta Imunitária

Foram imunizados murganhos subcutaneamente com 10 µg de ovalbumina no dia 0 e foi permitida a recuperação. No dia 40 após a imunização os animais foram injectados IP com 10 mg/kg de anticorpo 911 anti-NGF ou um anticorpo de controlo, de isotipo correspondente. Ao fim de dois dias os animais foram reforçados com ovalbumina. A resposta imunitária foi medida por ELISA em amostras de soro recolhidas no dia 47. Como pode ser observado na Figura 10, não se verifica diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na resposta imunitária entre os animais recebendo anticorpo 911 anti-NGF e animais recebendo o anticorpo de controlo. No entanto, verificou-se uma tendência não significativa para um aumento na resposta imunitária em animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-NGF.

Pelo contrário, a Figura 11 mostra que após imunização com gama-globulin de galinha, o tratamento com anti-NGF produz uma tendência não significativa para uma redução na resposta imunitária. Os animais foram imunizados com 10 µg de gama-globulina de galinha no dia 0 e tratados com anticorpo 911 anti-NGF ou um anticorpo de controlo, de isotipo correspondente (10 mg/kg IP) no dia 40. No dia 42 os animais foram reforçados com gama-globulina e no dia 47 foram recolhidas amostras de soro e analisadas por ELISA. Não se verificou qualquer diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na resposta imunitária entre os dois grupos. No entanto verificou-se uma tendência para uma redução na resposta imunitária após tratamento com o anticorpo monoclonal anti-NGF 911.

#### EXEMPLO 4

##### Efeito de Anticorpos Monoclonais Anti-NGF na Hiperálgia

Foi investigado o efeito de anticorpos anti-NGF na hiperálgia térmica induzida por NGF. Resumidamente, foram treinados ratos Fischer adultos do sexo feminino em duas sessões por dia com o teste do Hargreaves durante, pelo menos, dois dias antes do tratamento. Após familiarização com o equipamento e protocolo, os animais foram destinados aleatoriamente ao grupo de controlo ou experimental. Ambos os grupos foram testados para a sensibilidade de base e depois foram administradas injeções intraplantares numa pata num volume de 50 µL sob anestesia com isofluorano. As injeções em cada grupo continham carragenina a 1,25%, em combinação com 90 µg de anticorpo anti-NGF ou um anticorpo de controlo indiferente, de isotipo correspondente.

Foram medidas as latências de retracção térmica a 0, 2, 4, 6 e 24 horas após injeção pelo teste de Hargreaves. Como mostrado na Figura 12, às 4 e 6 horas após o tratamento a hiperalgesia térmica que se segue à injeção de carragenina foi significativamente reduzida em animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-NGF 911 em comparação com animais de controlo.

#### EXEMPLO 5

##### Efeito de Anticorpos Monoclonais Anti-NGF em Resposta a Alergénios

Foram tratados murganhos de sexo masculino C57/BL6 (Jackson Laboratories) foram tratados com o anticorpo monoclonal 911 anti-NGF (n = 16) ou anticorpo de controlo anti-gD de isotipo correspondente (clone 1766; n=16). No dia -1, os animais foram tratados com anticorpo 20 mg/kg e nos dias 6, 13, 20 e 22 estes foram tratados com anticorpo 10 mg/kg. Todos os tratamentos de anticorpo foram injectados subcutaneamente na nuca.

Nos dias 0 e 14 metade dos murganhos em cada grupo foi sensibilizada (SN) por injeção intraperitoneal de 30 AU do antigénio de ácaro (DMA; diluído com PBS de Dulbecco e depois 1:2 com ALUM, como um adjuvante, para uma concentração final de 300 AU/mL). Os murganhos não-sensibilizados (NS) receberam um volume igual de PBS de Dulbecco diluído 1:2 com ALUM como controlo.

Os murganhos foram então desafiados com antigénio de ácaro inalado (DMA) nos dias 21 e 22. O ácaro foi diluído para 6000 AU/mL utilizando PBS de Dulbecco mais Tween-20 a 0,01% para

aerossolização. Todos os desafios de inalação foram administrados numa câmara de exposição numa redoma em acrílico. O DMA foi aerossolizado utilizando um nebulizador PARI IS-2 operado a 22 PSI. O nebulizador foi preenchido com 3 mL e aplicado até à conclusão (30 min.). A dose/exposição depositada total no pulmão foi de ~6,5 AU DMA.

Os murganhos foram avaliados para a hiper-reatividade das vias aérea, infiltração celular no fluido de lavagem bronquiolar (BAL), níveis de citocina em BAL e título de soro contra ácaros assim como níveis séricos de IgE. Resumidamente, no dia 24, 48 horas após o último desafio, os murganhos foram anestesiados, cateterizados na veia jugular e traqueostomizados. Os murganhos foram então paralisados com pancurónio 0,28 mg/kg e colocados num pletismógrafo de fluxo em acrílico para a medição de expansão torácica e da pressão das vias aérea. Os murganhos foram ventilados utilizando oxigénio a 100% numa frequência de 170 bpm e Vt igual a 9 L/g. Foi monitorizada continuamente a mecânica da respiração (resistência pulmonar e conformidade dinâmica) utilizando o programa de aquisição de dados Buxco XA. Foi administrado um historial de volume aos murganhos (5 respirações a  $2,5 \times V_t$ ), foi permitida a estabilização durante 2 min antes da medição da linha de base e, depois, foi administrada uma única dose de 5 segundos do agonista a uma velocidade de fluxo ajustada ao peso corporal utilizando uma bomba de seringa de Harvard e um programa informático de aplicação de seringa.

Foram recolhidos sangue (soro), BAL e pulmões. O soro foi ensaiado para IgE e IgG totais e específicas. O BAL foi obtido injectando a mesma alíquota de NaCl 3 vezes e foi ensaiado para

IgE total por ELISA. Foram obtidos os leucócitos totais e os diferenciais celulares a partir de células de BAL.

O tratamento com o anticorpo monoclonal anti-NGF originou um abaixamento significativo na hiper-reatividade das vias aéreas (Fig. 13), assim como na inflamação como medida pela infiltração celular no BAL (Fig. 14). No entanto, existe ainda uma proporção muito elevada de eosinófilos no BAL de animais tratados com anti-NGF (Fig. 15). O tratamento com anticorpo anti-NGF reduziu também o nível da citocina Th2 IL-13 no BAL (Fig. 16).

Apesar da sua capacidade para reduzir a resposta inflamatória ao alergénio, o tratamento com anticorpo anti-NGF não reduziu a resposta imunitária humoral aos ácaros, como medida pelo título total de imunoglobulina de soro contra os ácaros (Fig. 17) ou pelo nível sérico de IgE (Fig. 18). Isto indica que o anticorpo bloqueou realmente o efeito biológico do NGF, mas não afectou a sobrevivência ou a função de linfócitos B.

Para confirmar que o anticorpo 911 anti-NGF estava a ter um efeito funcionalmente significativo sobre o NGF, foi realizada uma experiência em paralelo, em que os murganhos foram injectados subcutaneamente na nuca com anticorpo monoclonal 911 anti-NGF a 0,1, 1 ou 10 mg/kg nos dias 1 e 8 ou com NGF a 0,1, 1 ou 10 mg/kg nos dias 1, 3, 6 e 8. Os animais foram sacrificados no dia 9 e examinados para o nível do neuropéptido CGRP no gânglio trigeminal. O tratamento com 1 ou 10 mg/kg de NGF originou um aumento em CGRP, verificando que este péptido é regulado pelas níveis de NGF (Fig. 19). O tratamento com anticorpo monoclonal 911 anti-NGF a 1 ou 10 mg/kg originou uma

redução no conteúdo de CGRP do gânglio (Fig. 19), verificando que esta dose produz um bloqueamento funcionalmente significativo do NGF endógeno no momento em que a resposta imunitária estava a ocorrer na experiência descrita acima.

Lisboa, 8 de Novembro de 2011

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Quantidade eficaz de um anticorpo monoclonal anti-NGF humano (anti-hNGF) com capacidade de ligação a hNGF e inibição da ligação de hNGF a TrkA humano (hTrkA) *in vivo* para a utilização num método para controlar um estado relacionado com o NGF num doente humano,

em que o anticorpo monoclonal anti-hNGF reconhece um epitopo NGF seleccionado do grupo consistindo de: a) um epitopo compreendendo a região de ligação de NGF a TrkA e p75 sobreposta enrolamento  $\beta$  A'-A'' (V-1) e a região de ligação a TrkA dominante região em folha  $\beta$  C; e b) um epitopo compreendendo i) resíduos K32, K34 e E35 de hNGF; ii) resíduos Y79 e T81 de hNGF; iii) resíduos H84 e K88 de hNGF; iv) resíduo R103 de hNGF; v) resíduo E11 de hNGF; vi) resíduo Y52 de hNGF e vii) resíduos L112 e S113 de hNGF; e

em que o estado relacionado com o NGF é dor crónica.

2. Utilização de uma quantidade eficaz de um anticorpo monoclonal anti-NGF humano (anti-hNGF) para a preparação de um medicamento a ser administrado a um doente humano para controlar um estado relacionado com o NGF no referido doente e,

em que o anticorpo monoclonal anti-hNGF reconhece um epitopo hNGF seleccionado do grupo consistindo de: a) um epitopo compreendendo a região de ligação de NGF a TrkA e p75 sobreposta enrolamento  $\beta$  A'-A'' (v-1) e a região de ligação a TrkA dominante em folha  $\beta$  C; e b) um epitopo



compreendendo i) resíduos K32, K34 e E35 de hNGF; ii) resíduos Y79 e T81 de hNGF; iii) resíduos T-184 e K88 de hNGF; iv) resíduo R103 de hNGF; v) resíduo E11 de hNGF; vi) resíduo Y52 de hNGF; e vii) resíduos L112 e S113 de hNGF; e

em que o estado relacionado com o NGF é dor crónica.

3. Utilização de acordo com as reivindicações 1 ou 2, em que o anticorpo se liga a hNGF com uma afinidade na gama nanomolar, em particular em que a afinidade de ligação do referido anticorpo para hNGF é de cerca de 0,10 a cerca de 0,80 nM; em particular em que a afinidade de ligação do referido anticorpo a hNGF é de cerca de 0,1 a cerca de 0,75 nM; mais particularmente em que a afinidade de ligação do referido anticorpo a hNGF é de cerca de 0,18 a cerca de 0,72 nM.
4. Utilização de acordo com as reivindicações 1 ou 2, em que o referido anticorpo tem também capacidade de se ligar ao NGF murino (muNGF).
5. Utilização de acordo com as reivindicações 1 ou 2, em que o referido anticorpo é um fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno; em particular em que o referido fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno é seleccionado do grupo consistindo de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, diacorpos, moléculas de anticorpo de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticorpo; mais particularmente em que a referida molécula de anticorpo de cadeia única é uma molécula Fv de cadeia única (scFv).

6. Utilização de acordo com as reivindicações 1 ou 2, em que o referido anticorpo é quimérico; em que o referido anticorpo é humanizado; em que o referido anticorpo é humano; ou em que o referido anticorpo é um anticorpo bi-específico, em particular em que o referido anticorpo bi-específico tem uma especificidade anti-IgE.
7. Utilização de acordo com as reivindicações 1 ou 2, em que o referido anticorpo não apresenta qualquer efeito adverso significativo sobre o sistema imunitário do referido doente, em particular em que o referido anticorpo não apresenta qualquer efeito adverso significativo sobre a resposta imunitária humoral.
8. Utilização de acordo com as reivindicações 1 ou 2, em que o referido anticorpo reconhece um epítipo hNGF compreendendo os resíduos K32, K34, E35, Y79, T81, H84, K88 e R103 de hNGF.
9. Utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o referido anticorpo reconhece um epítipo compreendendo os resíduos K32, K34, E35, Y79, T81, H84, K88, R103, E11, Y52, L112 e S113 de hNGF.
10. Composição farmacêutica compreendendo um anticorpo monoclonal anti-NGF (anti-hNGF) humano quimérico, humanizado ou humano, como definido na reivindicação 1 ou 2, em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.
11. Composição farmacêutica da reivindicação 10, em que o referido anticorpo é um fragmento de anticorpo de ligação a

um antígeno; em particular em que o referido fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno é seleccionado do grupo consistindo de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, diacorpos, moléculas de anticorpo de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticorpo.

12. Composição farmacêutica da reivindicação 10, em que o referido anticorpo é um anticorpo bi-específico, em particular em que o referido anticorpo bi-específico tem capacidade de ligação específica a IgE humana nativa; em particular em que o referido anticorpo bi-específico tem capacidade de ligação específica ao TNF humano nativo ou a um receptor do TNF humano nativo.

13. Composição farmacêutica da reivindicação 10 compreendendo ainda outro ingrediente farmacêuticamente activo; em particular em que o referido outro ingrediente farmacêuticamente activo é adequado para o tratamento de um estado inflamatório; mais particularmente em que o referido estado inflamatório é seleccionado do grupo consistindo de dor, asma, esclerose múltipla, artrite, lúpus eritematoso e psoríase; mesmo mais particularmente em que a referida artrite é artrite reumatóide.

14. Artigo de produção compreendendo:

um recipiente;

uma composição farmacêutica da reivindicação 10; e instruções para a utilização da composição de matéria para

controlar um estado relacionado com o NGF num doente humano.

15. Artigo de produção da reivindicação 14 compreendendo ainda um segundo ingrediente farmacêuticamente activo; em particular em que o referido segundo ingrediente farmacêuticamente activo é adequado para a utilização no tratamento de um estado inflamatório; mais particularmente em que o referido estado inflamatório é seleccionado do grupo consistindo de dor, asma, esclerose múltipla, artrite, lúpus eritematoso e psoríase.
16. Artigo de produção da reivindicação 14 compreendendo ainda um segundo recipiente com uma composição aí contida, em que a composição compreende um segundo anticorpo que se liga a um receptor do NGF e bloqueia a activação de ligando.

Lisboa, 8 de Novembro de 2011

**FIG. 1**

Identificação de Regiões de ligação de Mab por Mutagênese de Rastreo de Homólogos								
Nome do Mutante <sup>a</sup>	Mutações NGF → NT3 introduzidas <sup>b</sup>	Região mutada <sup>c</sup>	908 <sup>d</sup>	909	911	912	938	14.14
Tipo selvagem	Nenhum		(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
6	S1Y, S2A, S3E, P5K, I6S, F7S	Terminal N	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)	(-)
20	V18E, V20L, G23T	Pré-VI (folha β A)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)
19	T26S, T27S, T29I, K32R, K34H, E35Q	V-1 (enrolamento em gancho β A'-A'')	(+ / +)	(+++)	(++)	(+ / +)	(++)	(+++)
12	V42I, N43K, I44T, N45G, V48P, F49V	V-2 (enrolamento em gancho β A'''-B)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
7	R59K, D60E, P61A, N62R, D65K, S66N	V-3 (enrolamento inverso β B-C)	(+++)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
16	Y79Q, T81K, T83S, H84Q, F86Y, K88R	V-4 (enrolamento β C)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)
8	M92S, D93E, G94N, +N94/95, Q96L, A97V, A98G	V-5 (enrolamento em gancho β C-D)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)
23	A116I, V117G, R119T, R120(-)	Terminal C	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+)	(+++)
Região do epítipo			V-2	V-3	V-1, V-4	V-1, V-5	C-term.	N-term.

<sup>a</sup>Os nomes dos mutantes foram atribuídos na ordem que estes foram preparados. <sup>b</sup>Resíduos de hNGF foram substituídos por resíduos não-homólogos de hNT3. As mutações são baseadas nos resíduos (símbolo de uma letra e número de posição) substituído pelo resíduo imediatamente após o número de posição indicado.

<sup>c</sup>cada uma das regiões variáveis de hNGF foi mutada para determinar a especificidade de ligação de cada Mab. <sup>d</sup>É comparada a ligação relativa de cada um dos seis Mab mutantes do rastreo de homólogos NGF/NT3 com a ligação de hNGF do tipo selvagem: (-), < 10 %; (+), 10-30%; (++) , 30-60%; (+++) , 60-100%. O EC<sub>50</sub> de cada Mab para a ligação a hNGF é: Mab 908, 1,8 x 10<sup>-10</sup> M; Mab 909, 1,8 x 10<sup>-10</sup> M; Mab 911, 3,7 x 10<sup>-10</sup> M; Mab 912, 1,8 x 10<sup>-10</sup> M; Mab 938, 7,4 x 10<sup>-10</sup> M; Mab 14.14, 5,9 x 10<sup>-10</sup> M.

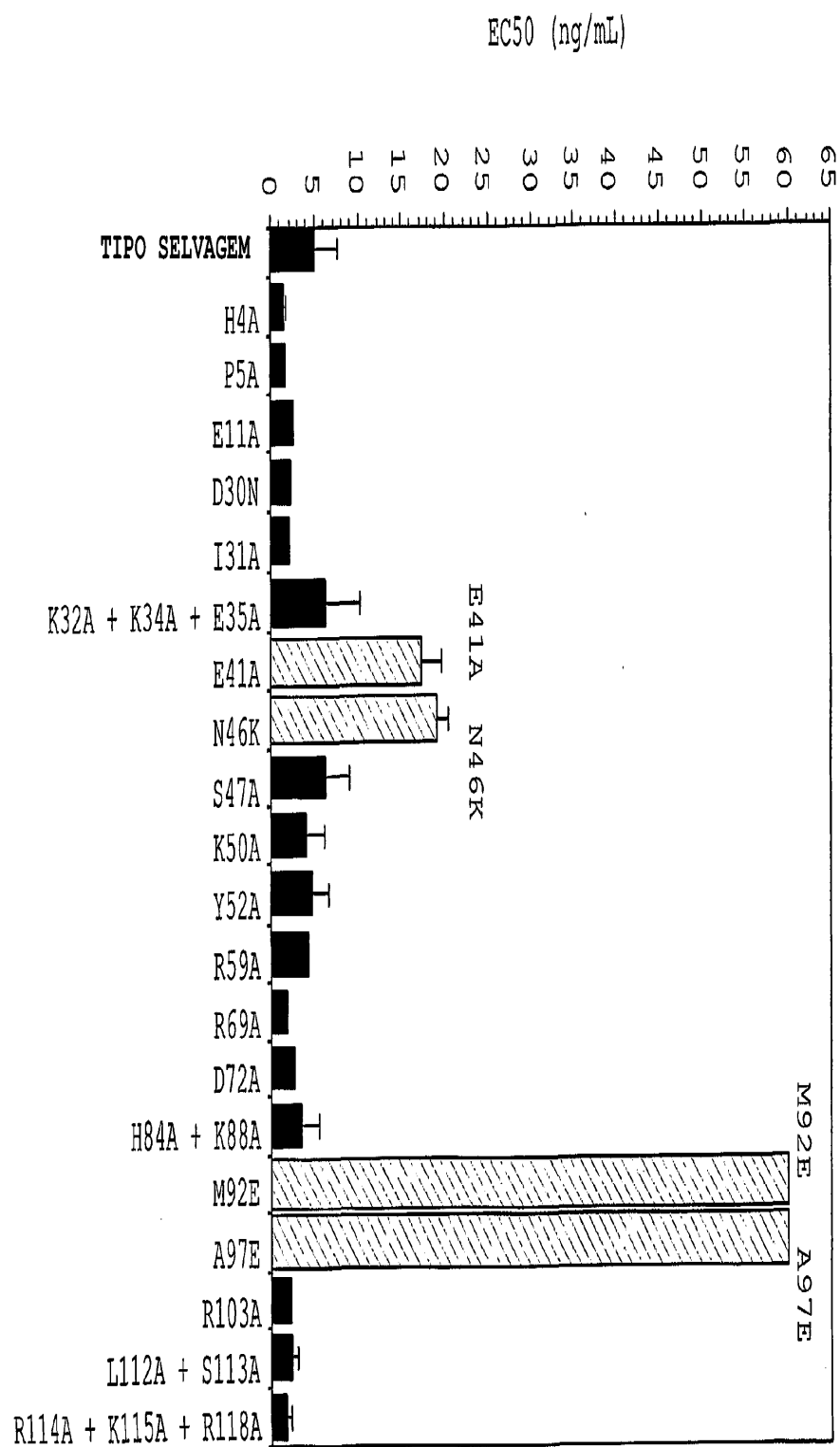
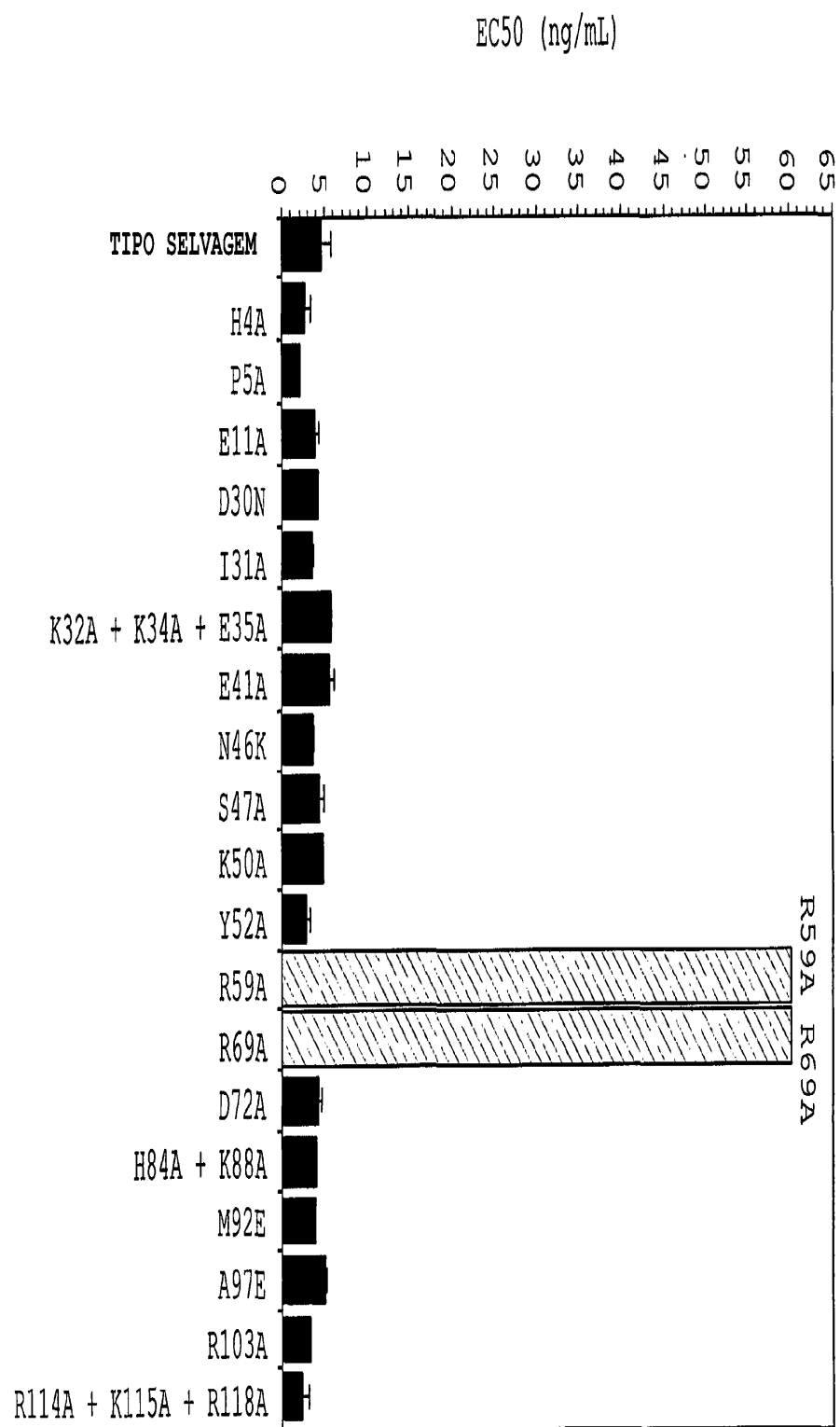


FIG. 2A

FIG. 2B



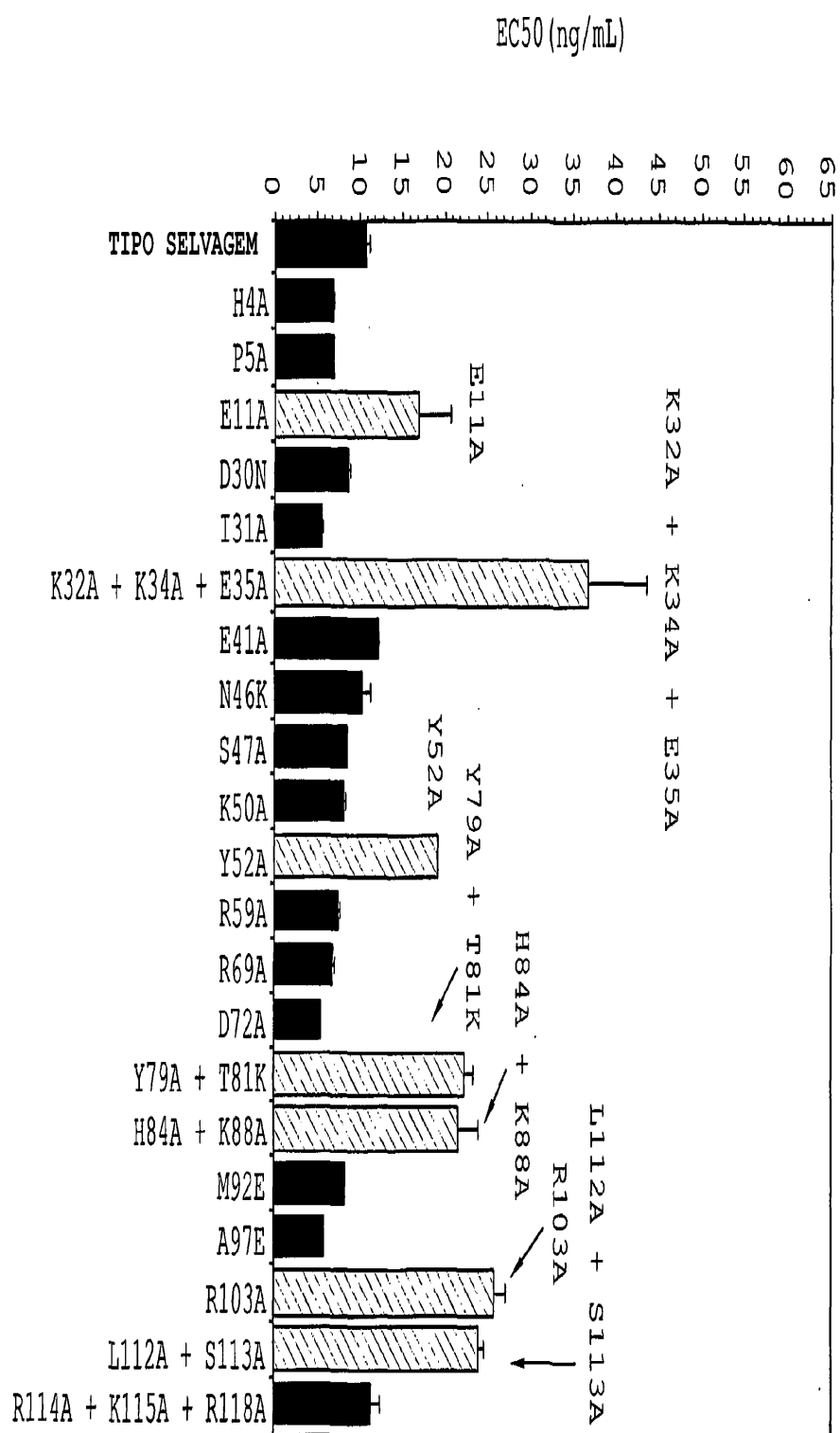


FIG. 2C



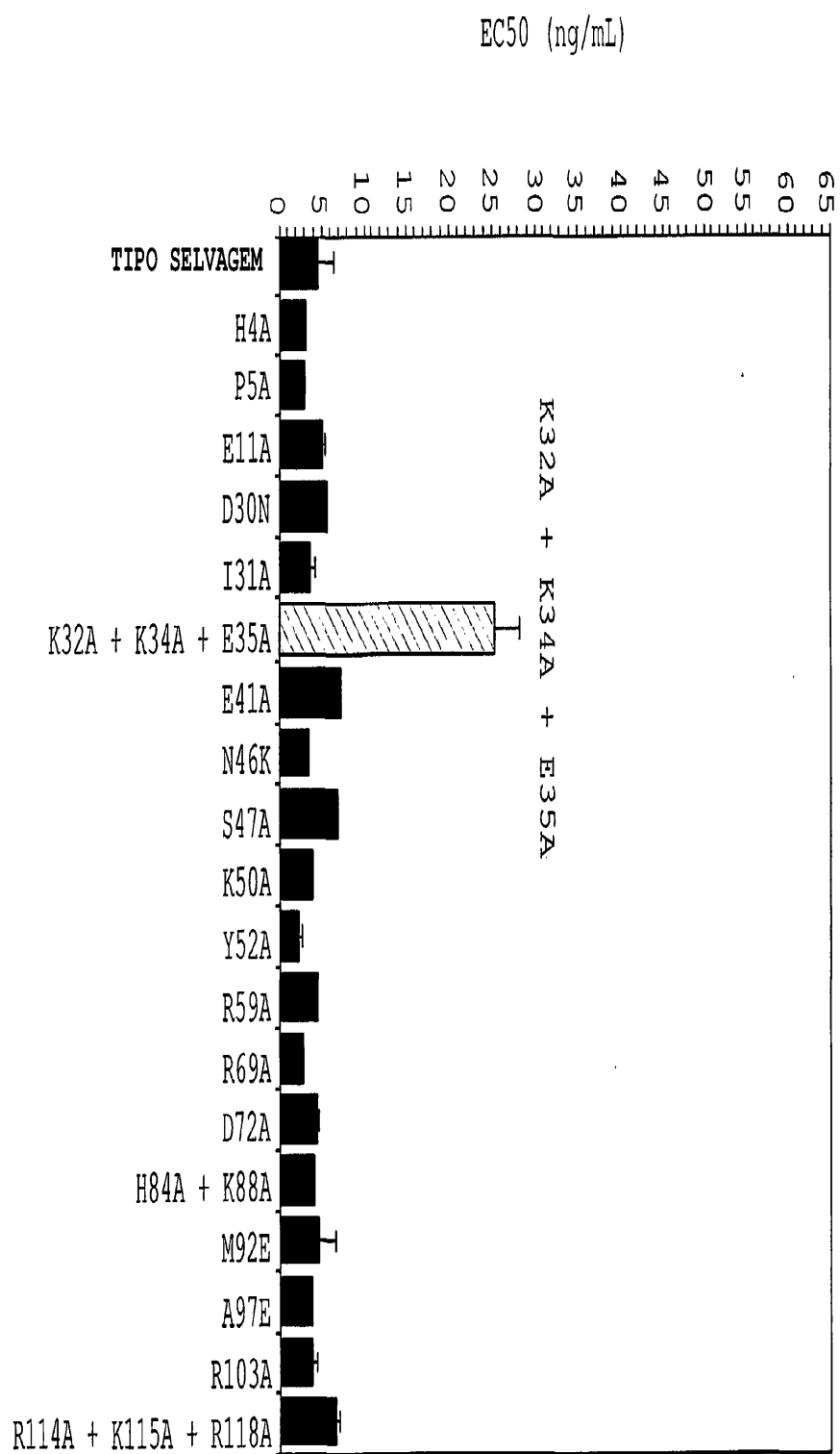


FIG. 2D

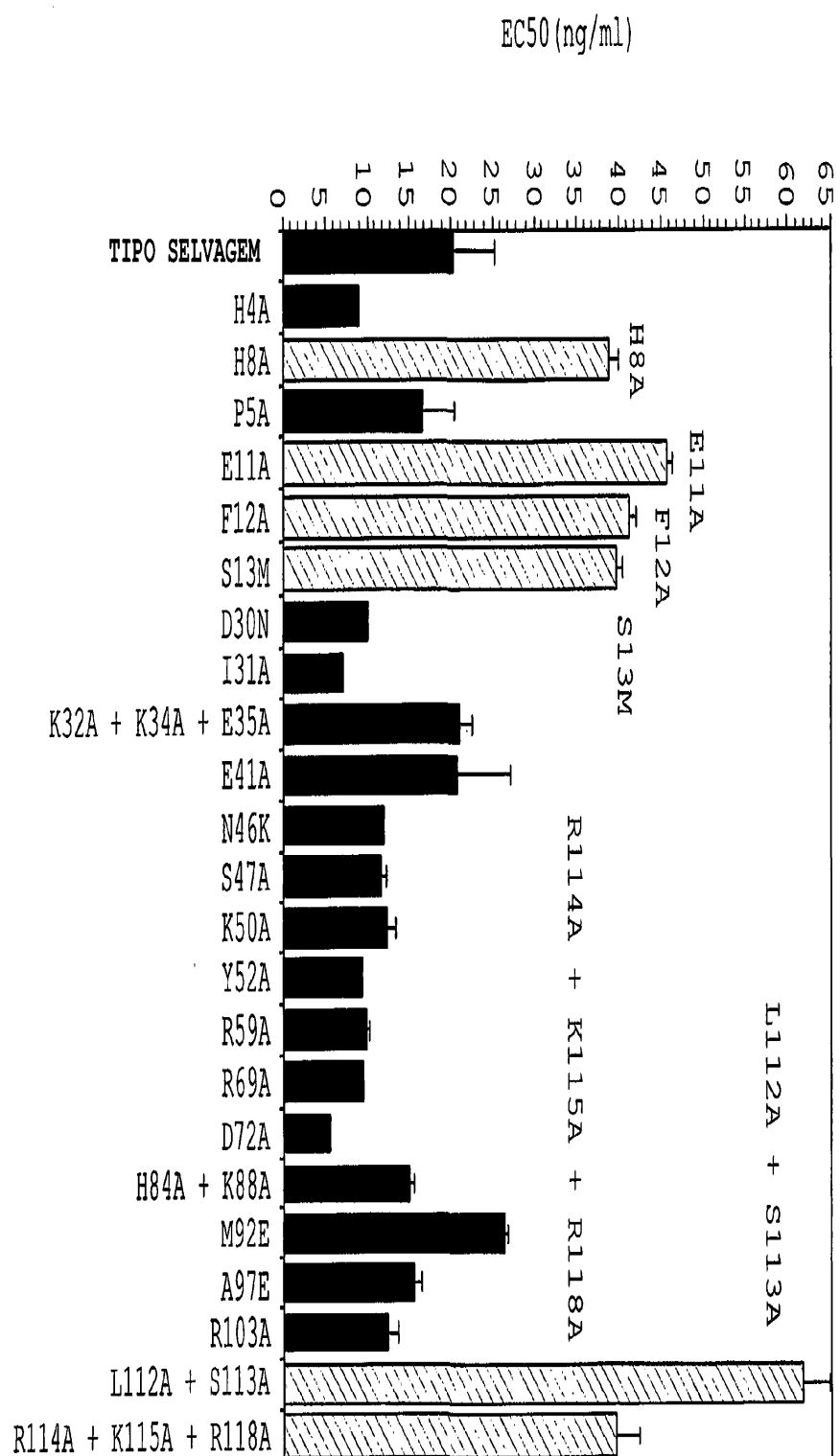


FIG. 2E

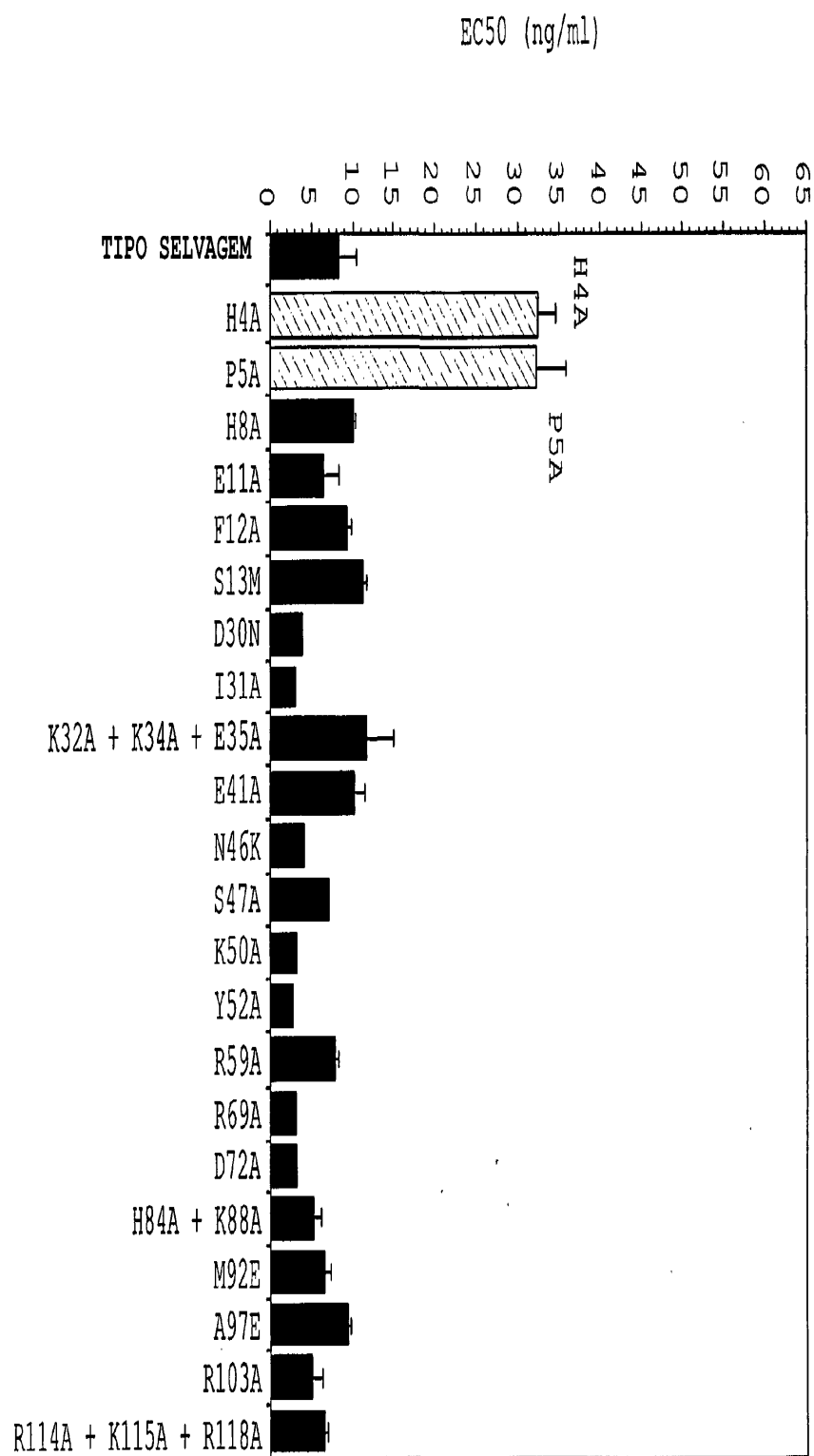


FIG. 2F

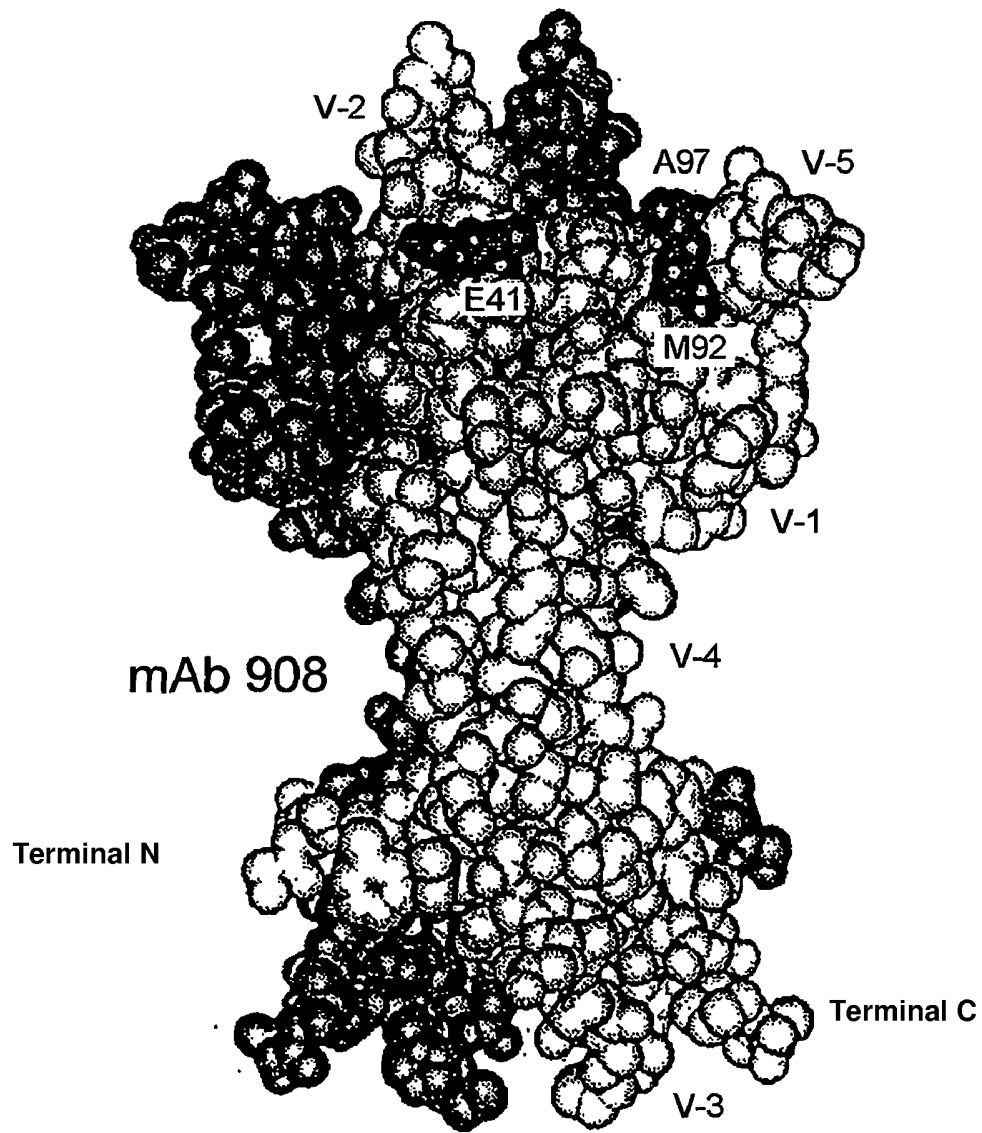


FIG. 3A

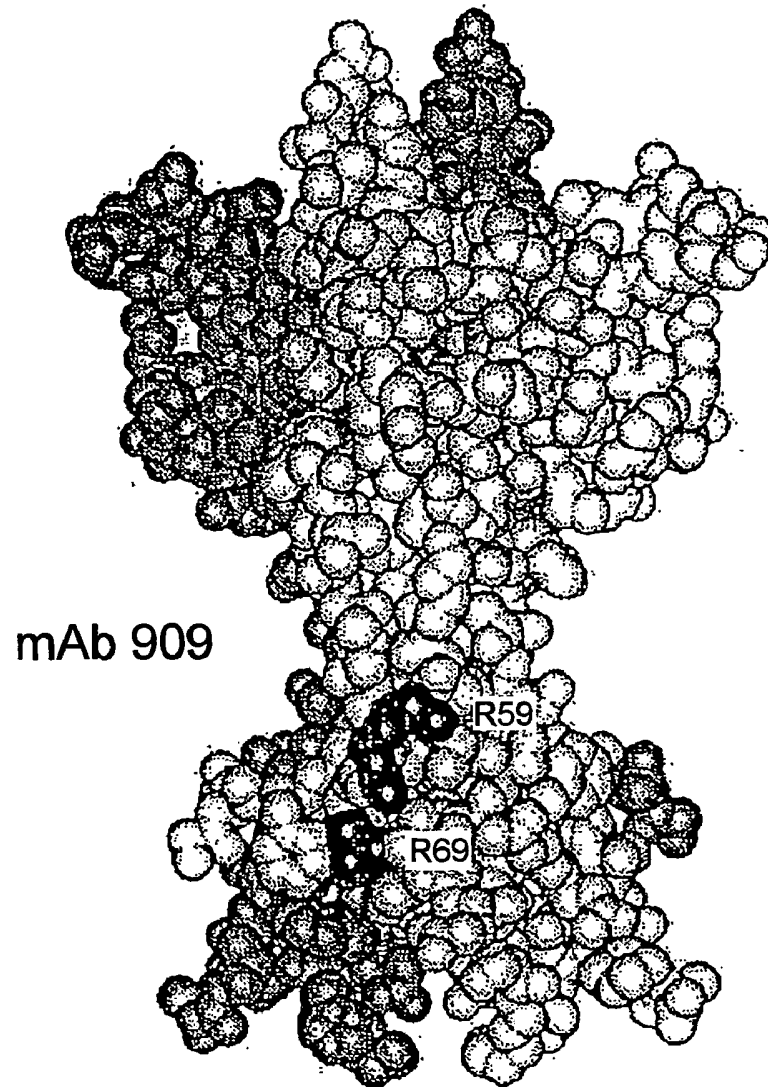


FIG. 3B

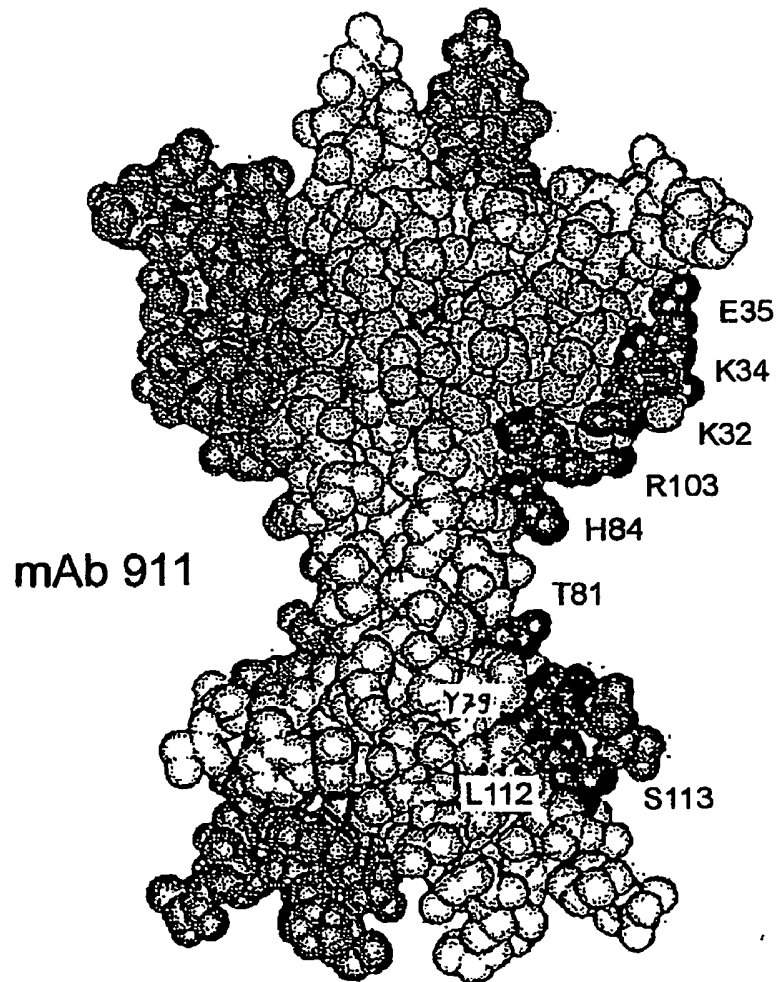


FIG. 3C

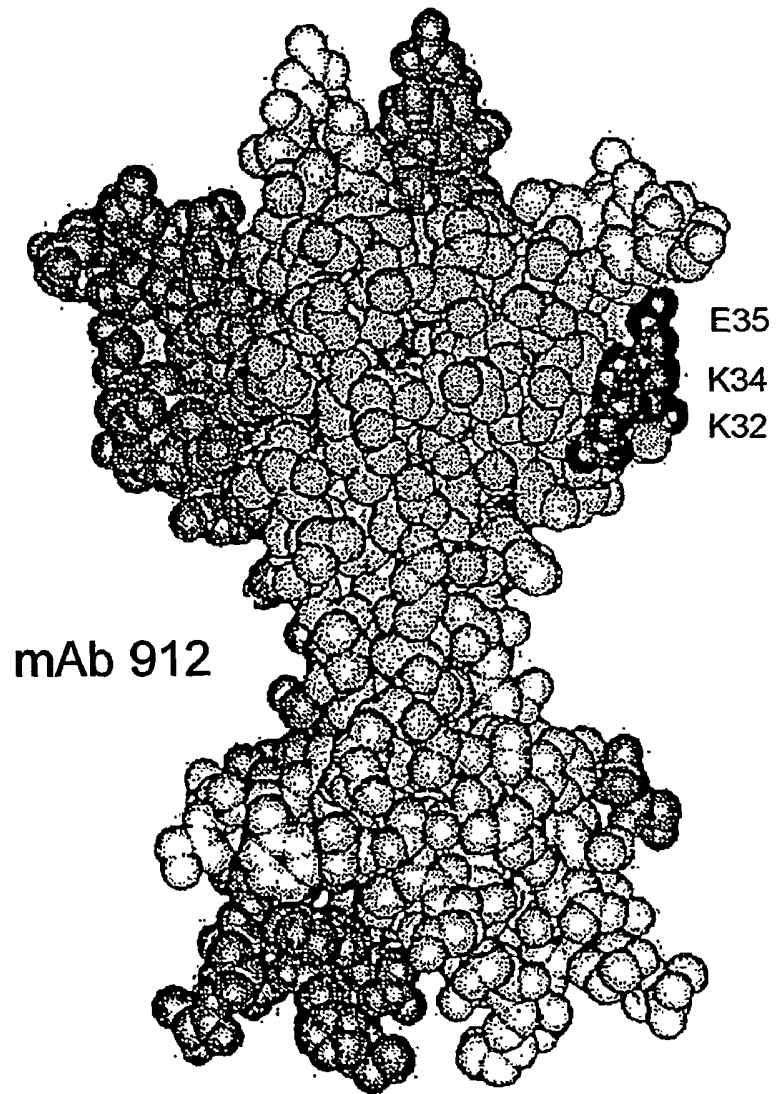


FIG. 3D

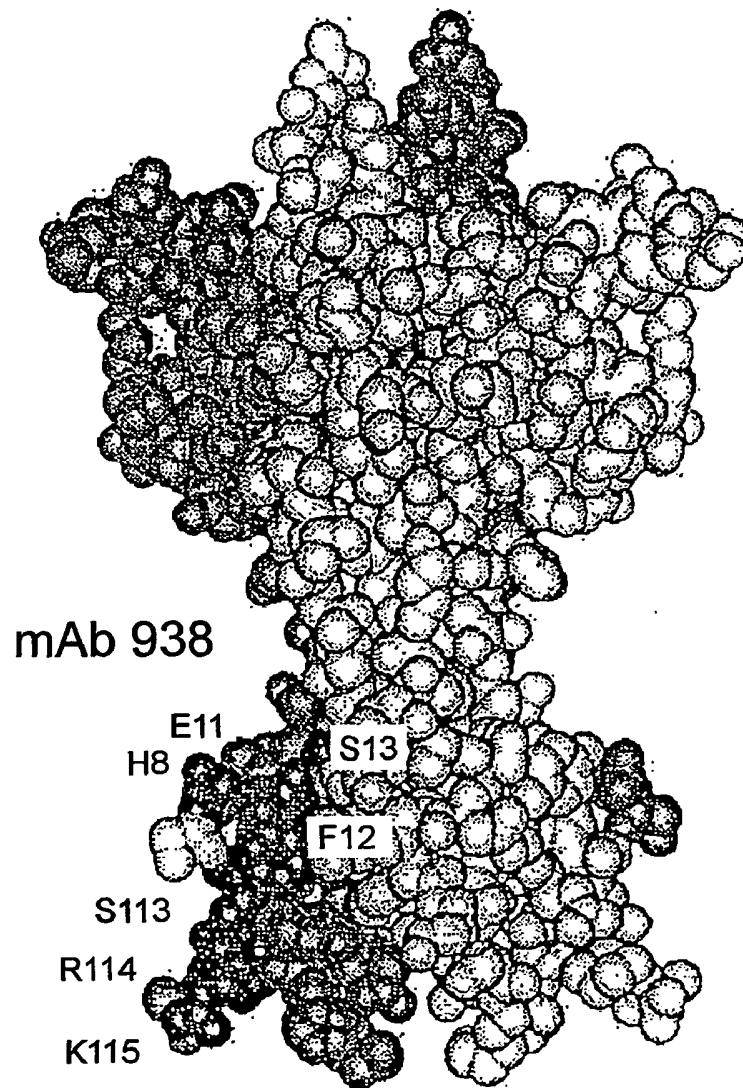


FIG. 3E



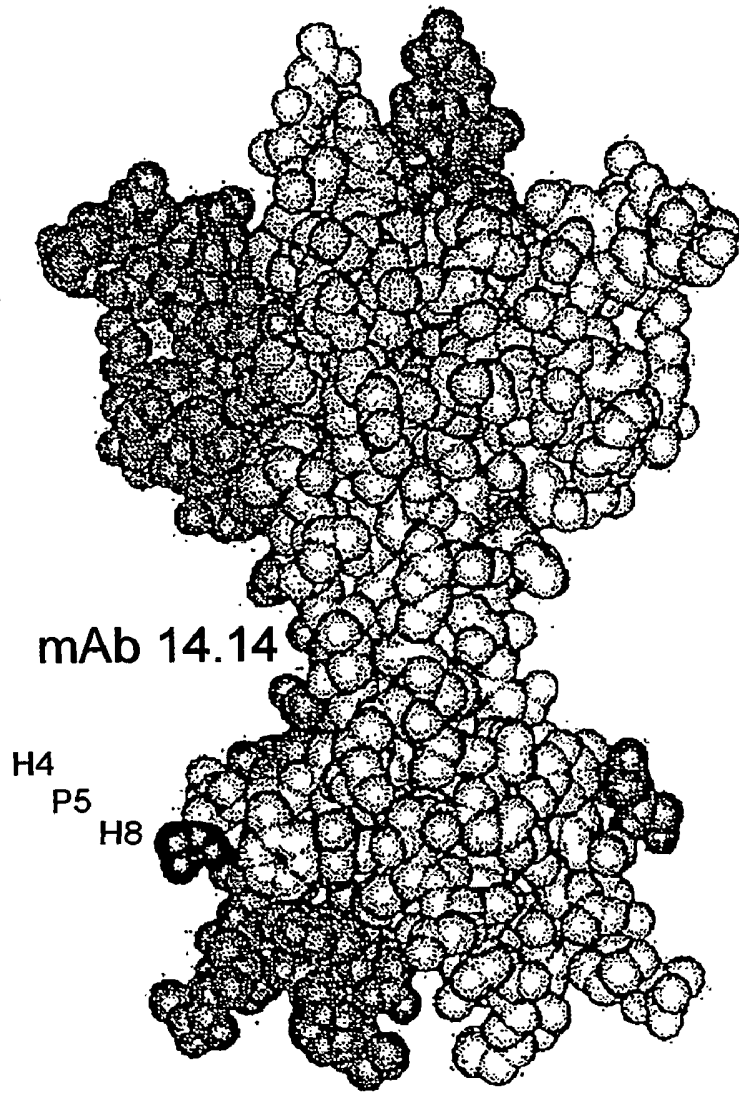


FIG. 3F

FIG.4A

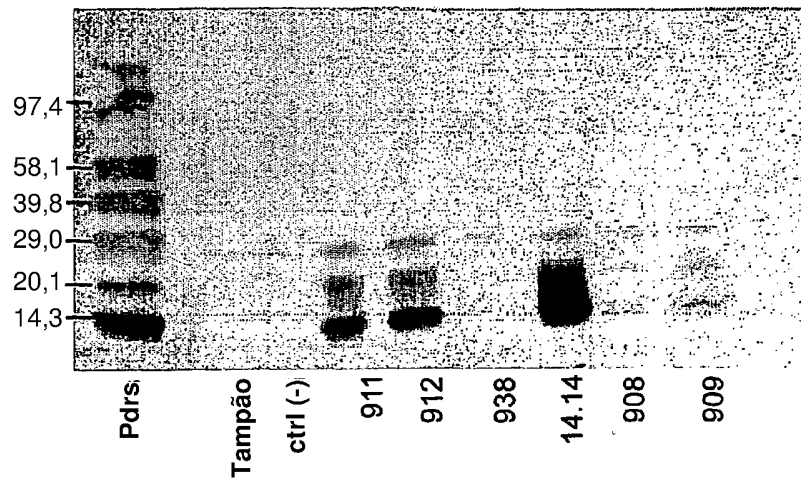


FIG. 4B

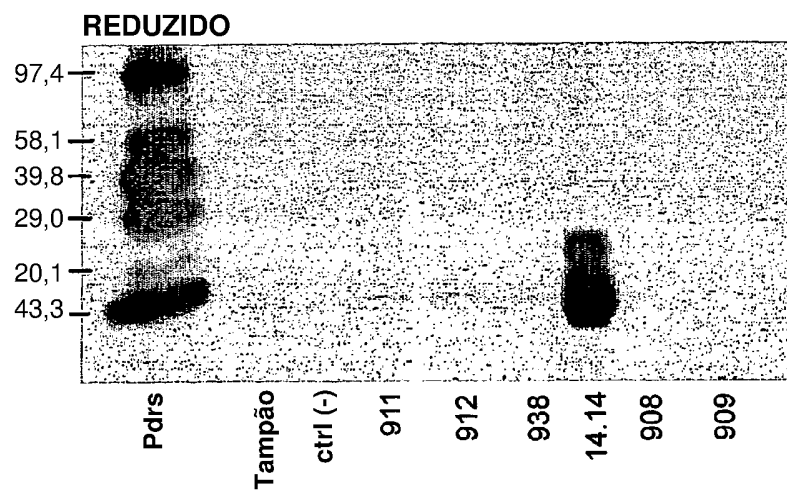


FIG 5

## Sumário dos Resultados de Mapeamento de Mab

Mab	Mutações pontuais em regiões de ligação de NGF	Local de ligação a TrkA ESTRUTURA NGF/TrkA <sup>a</sup>	Local de ligação a p75 mutagénesse NGF-3 <sup>b</sup>	Actividade de bloqueamento de TrkA	Actividade de bloqueamento de p75
908	M92, M97, E41, N46	Não	Não	(+/-)	(+/-)
909	R59, R69	Não	Sim	(-)	(++)
911	Várias	Sim	Sim	(++)	(++)
912	Várias	Não	Sim	(++)	(++)
938	L112/S113	Sim	Sim	(++)	(+)
14.14	H4, P5	Sim	Não	(+/-)	(-)

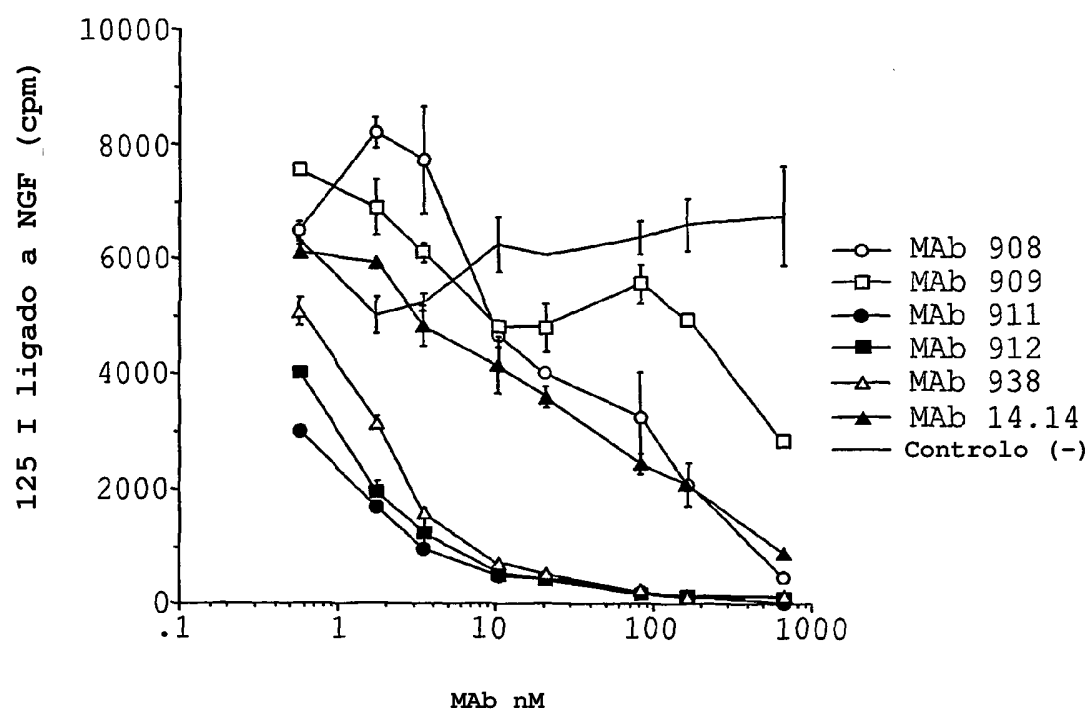


FIG. 6

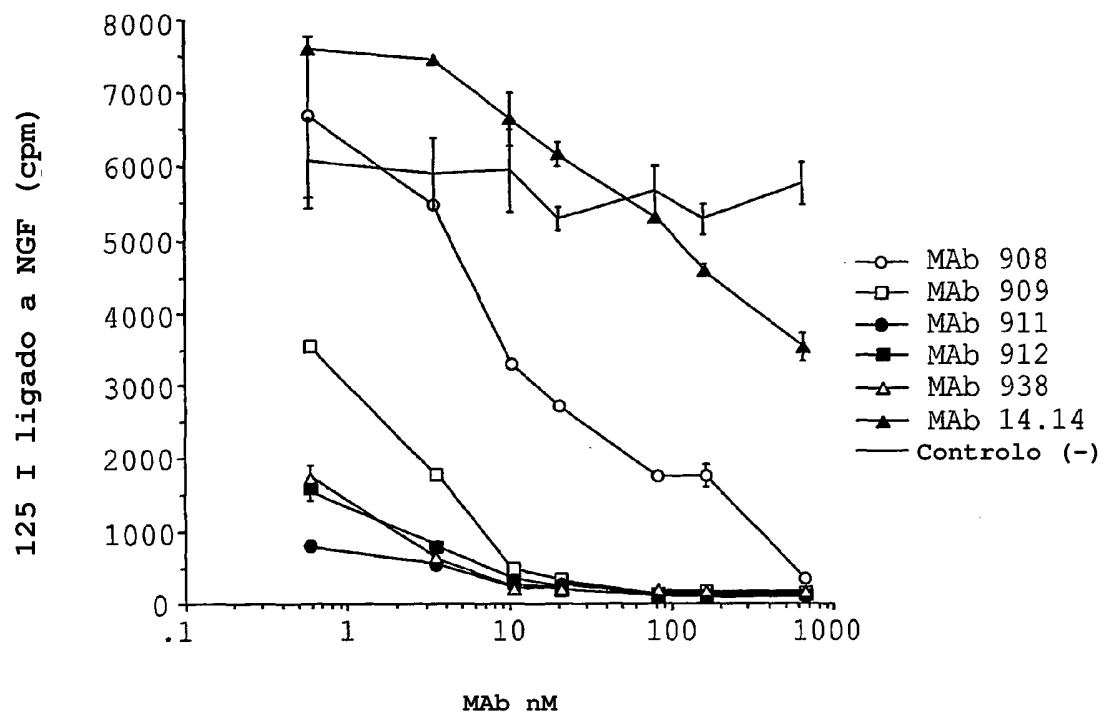


FIG. 7

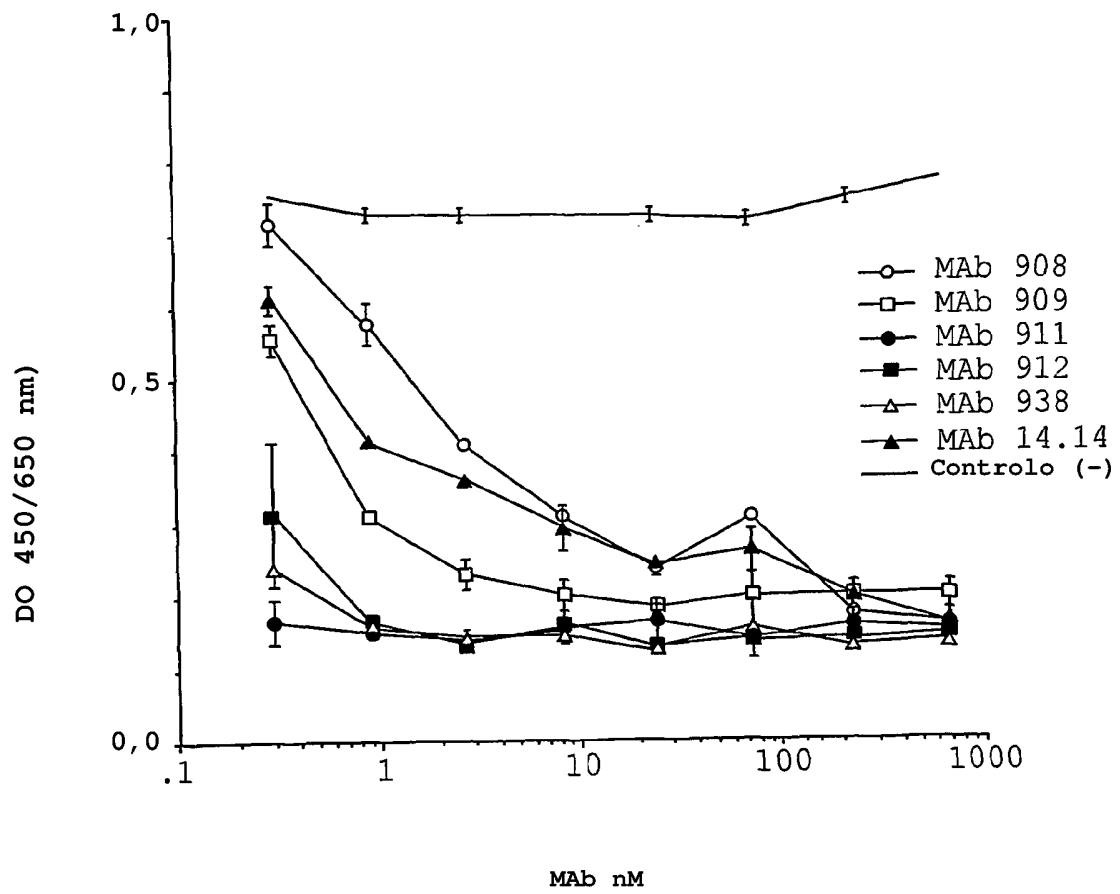
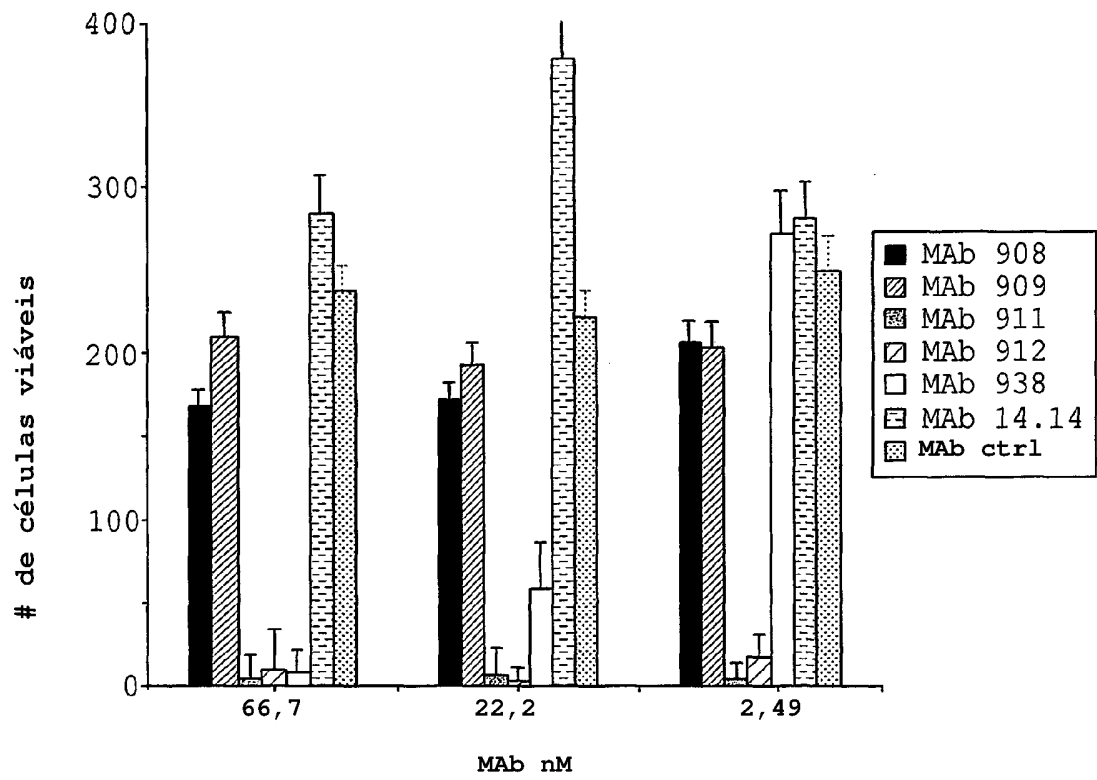
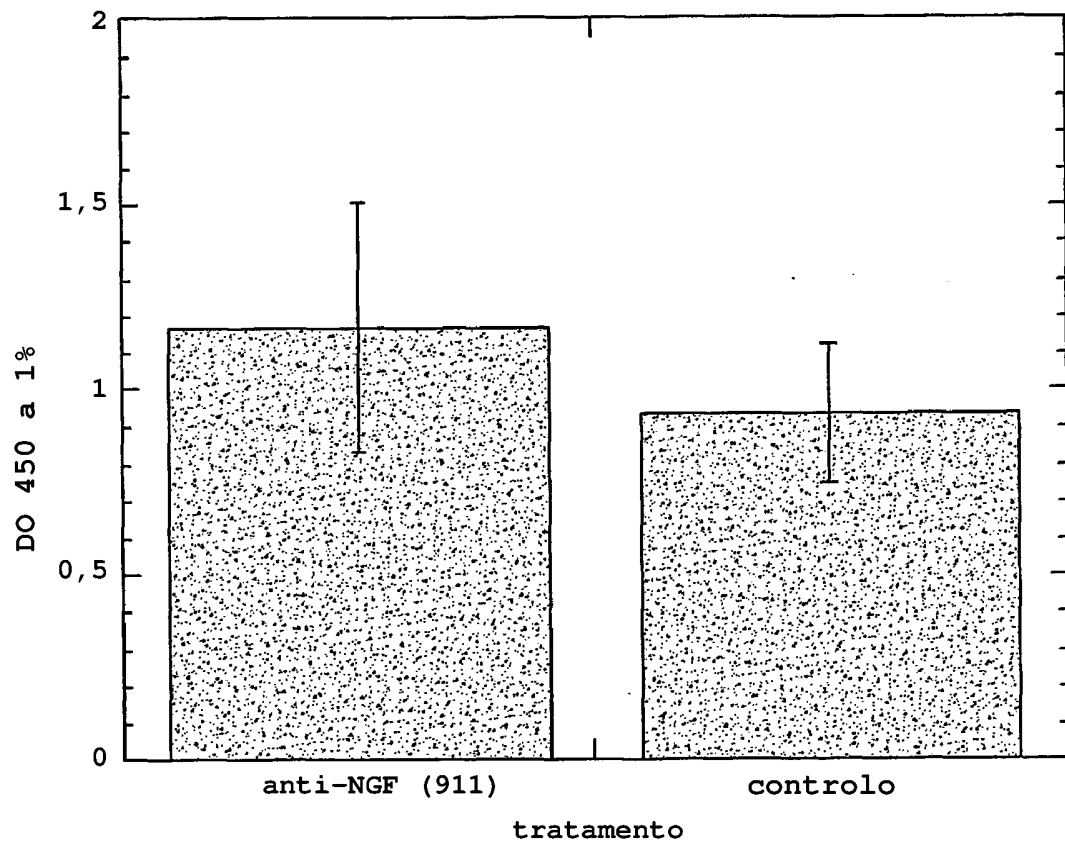


FIG. 8

*FIG. 9*

*FIG. 10*



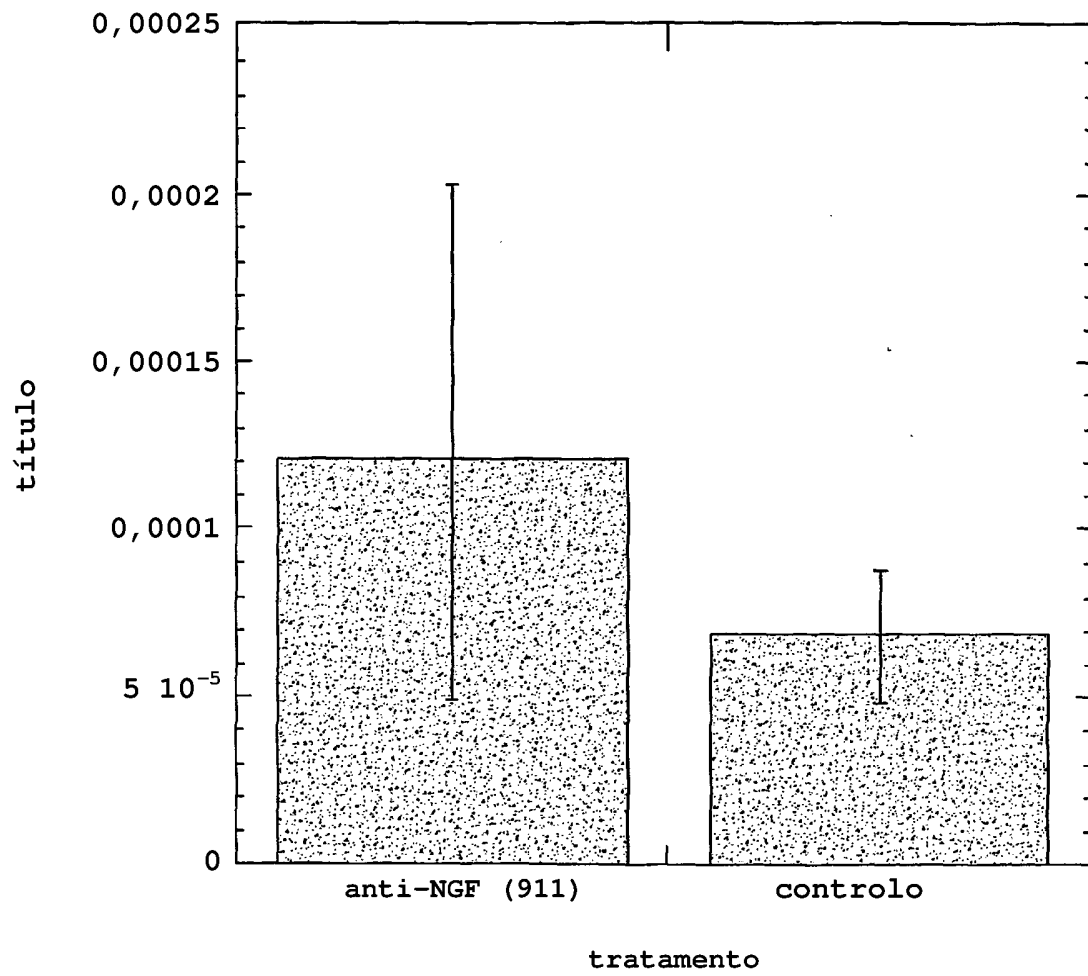
*FIG. 11*

FIG. 12

**Anticorpo Monoclonal contra NGF**  
**Bloqueia a Hiperalgesia Térmica**

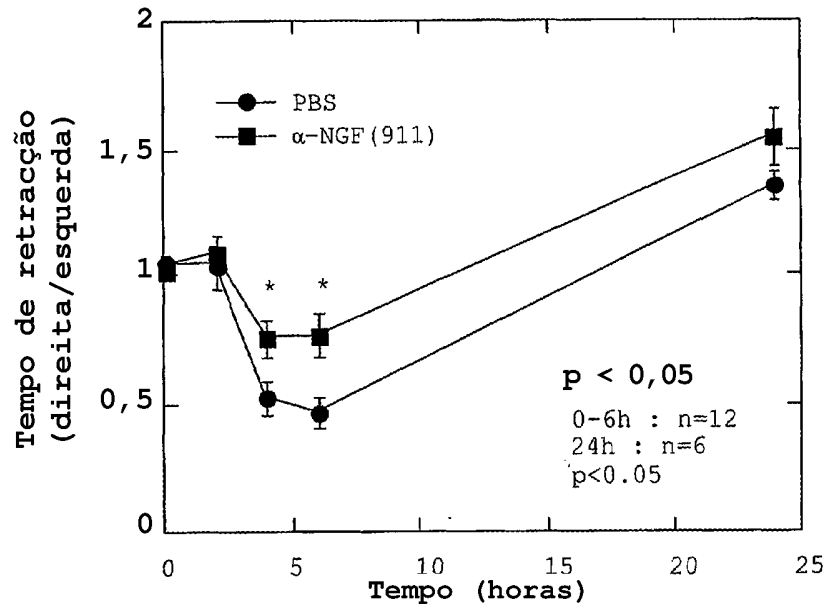
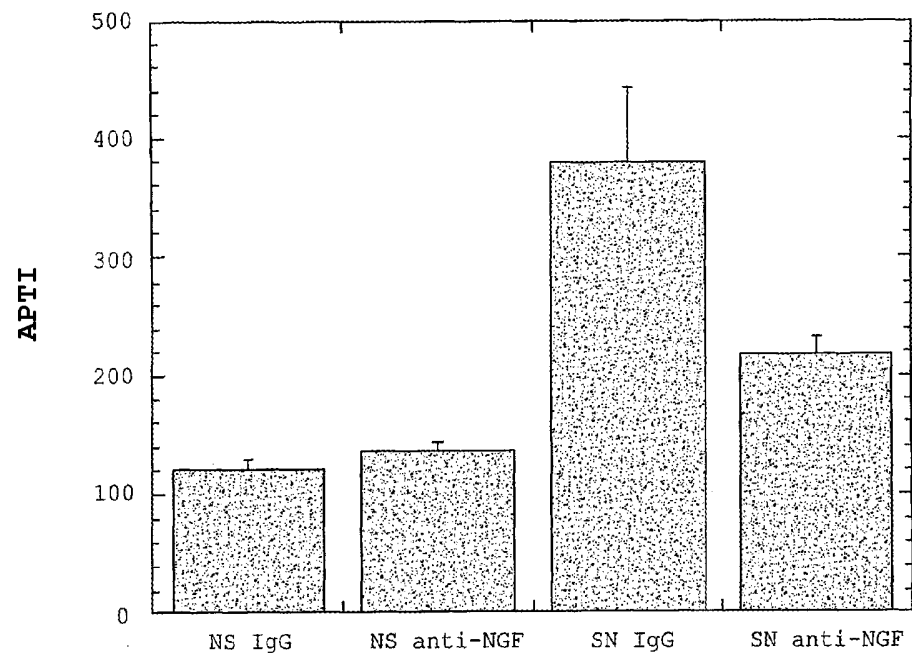


FIG. 13

**Tratamento anti-NGF inibe a  
hiperreatividade das vias  
respiratórias**



**Tratamento com anti-NGF reduz a  
infiltração celular em BAL**

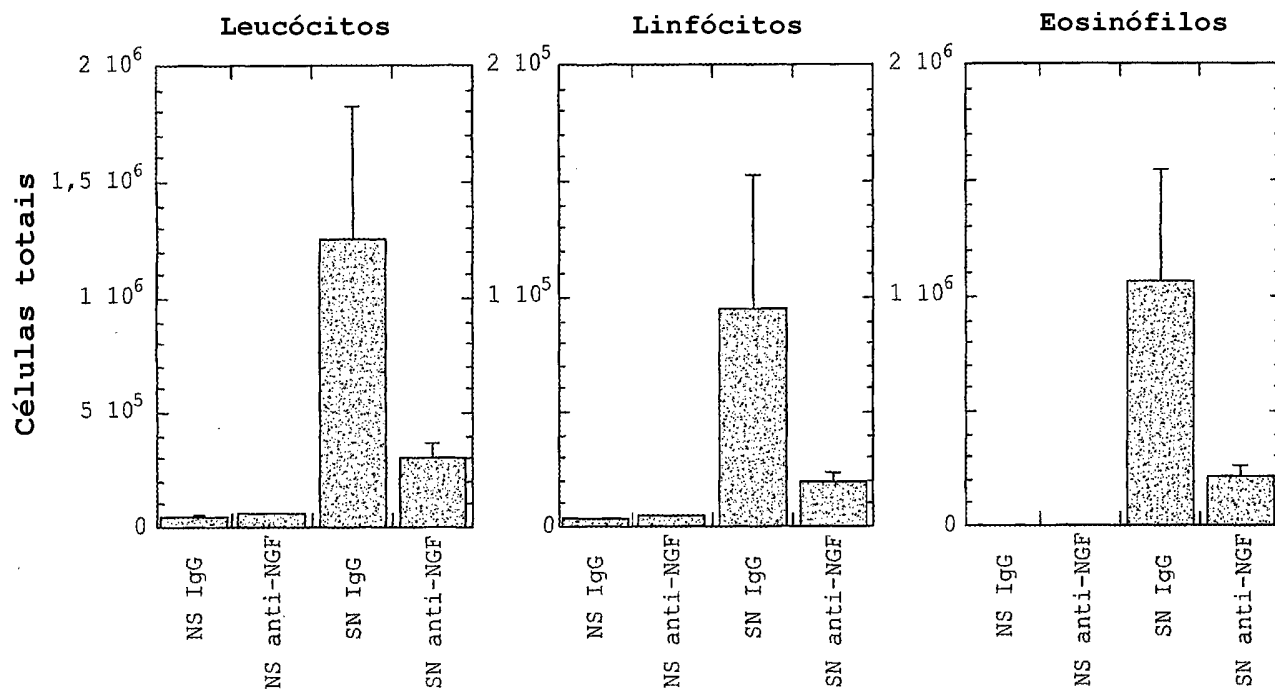


FIG. 14A

FIG. 14B

FIG. 14C

FIG. 15

Existe ainda uma proporção muito elevada de eosinófilos no BAL provenientes de animais anti-NGF

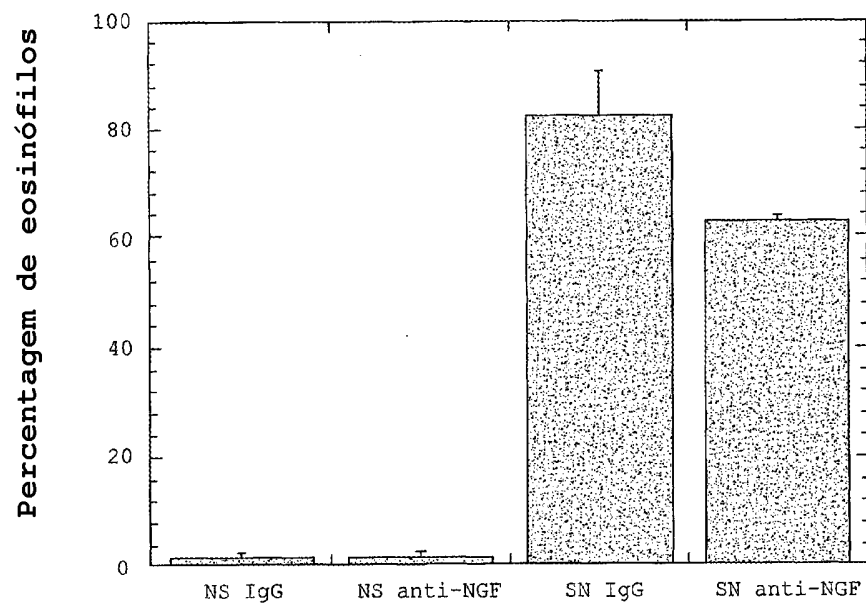


FIG. 16

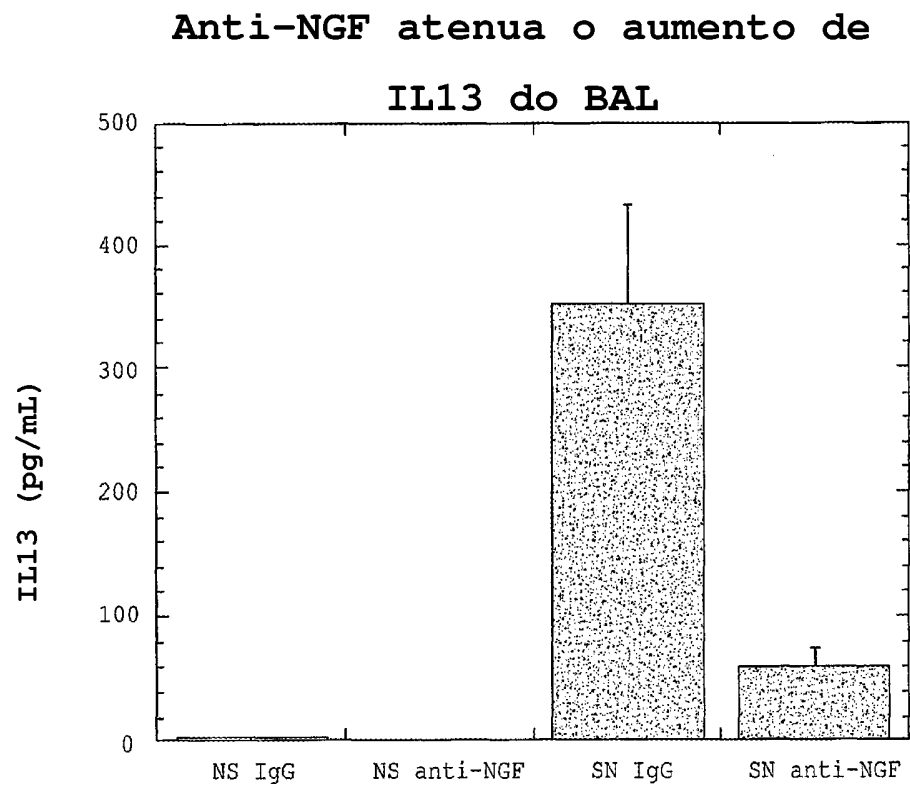


FIG. 17

Anti-NGF não inibe a resposta  
imunitária humoral ao antígeno do  
ácaro

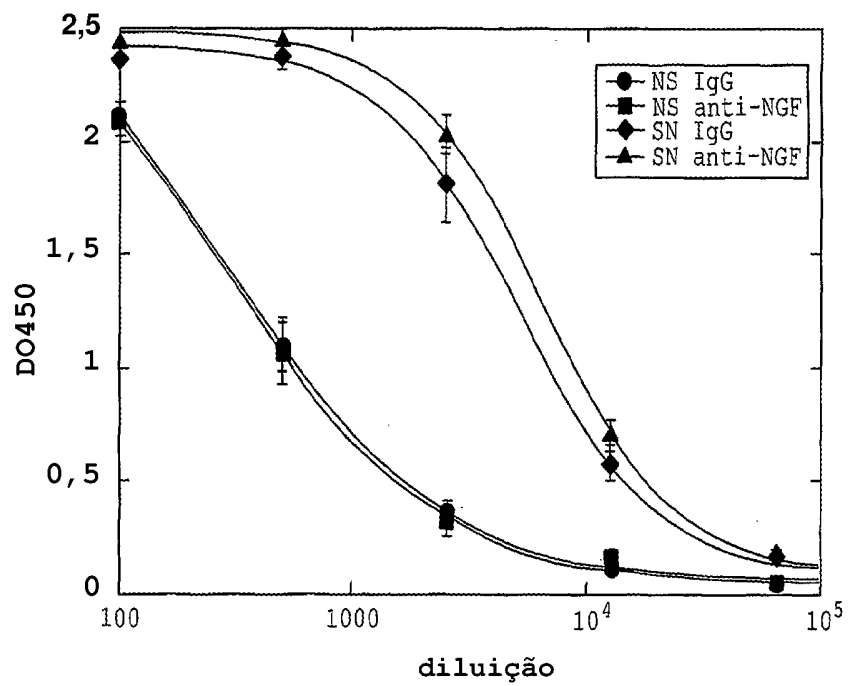


FIG. 18

## Anti-NGF não inibe IgE sérica

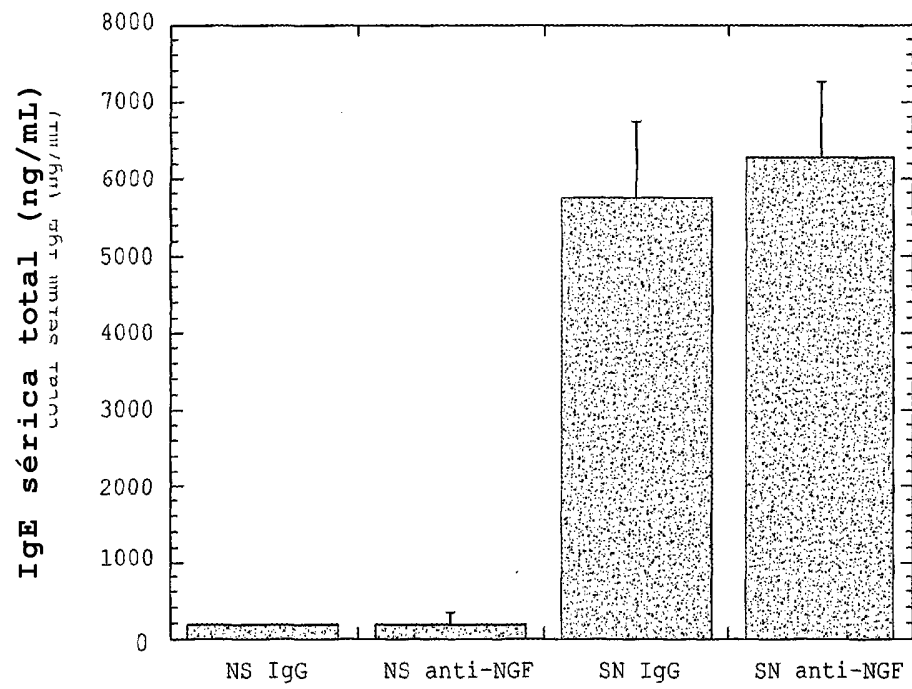




FIG. 19

Tratamento com NGF aumenta e tratamento com anti-NGF reduz o conteúdo em CGRP do gânglio trigeminal

