

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

(22) Data de pedido: <b>2003.10.08</b>	(73) Titular(es): <b>RINAT NEUROSCIENCE CORP.</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2002.10.08 US 417237 P</b>	<b>230 EAST GRAND AVENUE SOUTH SAN</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2005.07.27</b>	<b>FRANCISCO, CA 94080</b>	<b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2011.02.02</b> <b>053/2011</b>	(72) Inventor(es): <b>DAVID L. SHELTON</b> <b>GERMAN J. VERGARA</b>	<b>US</b> <b>US</b>
	(74) Mandatário: <b>MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA</b> <b>AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA TRATAR A DOR PÓS-CIRÚRGICA PELA ADMINISTRAÇÃO DE UM ANTICORPO CONTRA O FACTOR DE CRESCIMENTO NERVOSO E COMPOSIÇÕES QUE CONTÊM O MESMO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA PREVENIR OU TRATAR A DOR QUE RESULTA DA CIRURGIA OU DE UMA INCISÃO PELA ADMINISTRAÇÃO DE UM ANTAGONISTA DE FACTOR DE CRESCIMENTO NERVOSO (NGF). O ANTAGONISTA DE NGF PODE SER UM ANTICORPO ANTI-NGF (TAL COMO UM ANTI-HNGF) QUE É CAPAZ DE SE LIGAR A HNGF.

**RESUMO****"MÉTODOS PARA TRATAR A DOR PÓS-CIRÚRGICA PELA ADMINISTRAÇÃO  
DE UM ANTICORPO CONTRA O FACTOR DE CRESCIMENTO NERVOSO E  
COMPOSIÇÕES QUE CONTÊM O MESMO"**

A invenção refere-se a métodos e composições para prevenir ou tratar a dor que resulta da cirurgia ou de uma incisão pela administração de um antagonista de factor de crescimento nervoso (NGF). O antagonista de NGF pode ser um anticorpo anti-NGF (tal como um anti-hNGF) que é capaz de se ligar a hNGF.

## DESCRIÇÃO

### **"MÉTODOS PARA TRATAR A DOR PÓS-CIRÚRGICA PELA ADMINISTRAÇÃO DE UM ANTICORPO CONTRA O FACTOR DE CRESCIMENTO NERVOSO E COMPOSIÇÕES QUE CONTÊM O MESMO"**

#### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um anticorpo anti-factor de crescimento nervoso (NGF) para a utilização na prevenção, na melhoria ou no tratamento da dor pós-cirúrgica.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O factor de crescimento nervoso (NGF) foi a primeira neurotrofina que foi identificada e o seu papel no desenvolvimento e sobrevivência de neurónios tanto periféricos como centrais foi bem caracterizado. Foi demonstrado que NGF é um factor crítico de sobrevivência e manutenção no desenvolvimento de neurónios sensoriais embrionários e simpáticos periféricos e de neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal (Smeyne, *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, *et al.*, Nature 337:362-364 (1989)), e sua actividade está mediada através de dois receptores diferentes ligados à membrana, o receptor de tirosina quinase TrkA e o receptor p75 que está estruturalmente relacionado com outros membros da família de receptores do factor de necrose tumoral (Chao, *et al.*, Science 232:518-521 (1986)).

Além dos seus efeitos no sistema nervoso, o NGF tem sido cada vez mais implicado em processos fora do sistema nervoso. Por exemplo, o NGF mostrou que potencia a permeabilidade vascular (Otten, *et al.*, Eur J Pharmacol. 106:199-201 (1984)), potencia as respostas imunes de

células T e B (Otten, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10059-10063 (1989)), induz a diferenciação de linfócitos e a proliferação de mastócitos e provoca a libertação de sinais biológicos solúveis a partir de mastócitos (Matsuda, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6508-6512 (1988); Pearce, et al., J. Physiol. 372:379-393 (1986); Bischoff, et al., Blood 79:2662-2669 (1992); Horigome, et al., J. Biol. Chem. 268:14881-14887 (1993)). Embora o NGF adicionado de maneira exógena tenha demonstrado que pode ter todos estes efeitos, é importante observar que foi demonstrado somente poucas vezes que o NGF endógeno é importante em qualquer destes processos *in vivo* (Torcia, et al., Cell. 85(3): 345-56 (1996)). Portanto, não está claro qual pode ser o efeito, se existe algum, resultante da inibição da bioactividade de NGF endógeno.

O NGF é produzido por meio de vários tipos de células incluindo mastócitos (Leon, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3739-3743 (1994)), linfócitos B (Torcia, et al., Cell 85:345-356 (1996)), queratinócitos (Di Marco, et al., J. Biol. Chem. 268:22838-22846)), células de músculo liso (Ueyama, et al., J. Hypertens. 11:1061-1065 (1993)), fibroblastos (Lindholm, et al., Eur. J. Neurosci. 2:795-801 (1990)), células epiteliais brônquicas (Kassel, et al., Clin. Exp. Allergy 31:1432-40 (2001)), células mesangiais renais (Steiner, et al., Am. J. Physiol. 261:F792-798 (1991)) e miotubos do músculo esquelético (Schwartz, et al., J Photochem, Photobiol. B 66:195-200 (2002)). Foram encontrados receptores de NGF numa variedade de tipos de células fora do sistema nervoso. Por exemplo, foi encontrado TrkA em mastócitos, linfócitos T e B e monócitos humanos.

Foi observada uma associação entre um aumento dos níveis de NGF e uma variedade de estados inflamatórios em pacientes humanos assim como também em vários modelos animais. Estes incluem lúpus eritematoso sistémico (Bracci-

Laudiero, et al., *Neuroreport* 4:563-565 (1993)), esclerose múltipla (Bracci-Laudiero, et al., *Neurosci. Lett.* 147:9-12 (1992)), psoríase (Raychaudhuri, et al., *Acta Derm. l'enereol.* 78:84-86 (1998)), artrite (Falcimi, et al., *Ann. Rheum. Dis.* 55:745-748 (1996)), cistite intersticial (Okragly, et al., *J. Urology* 161:438-441 (1991)) e asma (Braun, et al., *Eur. J Immunol.* 28:3240-3251 (1998)).

Consistentemente, um nível elevado de NGF em tecidos periféricos está associado à inflamação e foi observado em várias formas de artrite. A sinóvia de pacientes afectados por artrite reumatóide expressa altos níveis de NGF, enquanto que foi relatado que na sinóvia não inflamada NGF é indetectável (Aloe, et al., *Arch. Rheum.* 35:351-355 (1992)). Observaram-se resultados similares em ratos com artrite reumatóide induzida experimentalmente (Aloe, et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:203-204 (1992)). Foram relatados níveis elevados de NGF em ratinhos artríticos transgénicos acompanhado de um aumento do número de mastócitos. (Aloe, et al., *Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects* 15:139-143 (1993)).

O tratamento com NGF exógeno conduz a um aumento da dor e sensibilidade à dor. Isto é ilustrado por meio do facto de que a injeção de NGF conduz a um aumento significativo da dor e da sensibilidade à dor tanto em modelos animais (Amann, et al., *Pain* 64, 323-329 (1996); Andreev, et al., *Pain* 63, 109-115 (1995)) como em seres humano (Dyck, et al., *Neurology* 48, 501-505 (1997); Petty, et al., *Annals Neurol.* 36, 244-246 (1994)). O NGF parece actuar por meio de múltiplos mecanismos incluindo a indução da neurotrofina BDNF (Apfel, et al., *Mol. Cell. Neurosci.* 7(2), 134-142 (1996); Michael, et al., *J. Neurosci* 17, 8476-8490 (1997)) que por sua vez muda o processamento de sinal da dor na medula espinhal (Hains, et al., *Neurosci Lett.* 320(3), 125-8 (2002); Miletic, et al., *Neurosci Lett.* 319(3), 137-40 (2002); Thompson, et al., *Proc Natl Acad Sci*

USA 96(14), 7714-8 (1999)), a indução de mudanças nas conexões centrais e periféricas dos neurónios sensoriais e outros neurónios de transmissão de dor na medula espinhal (Lewin, et al., *European Journal of Neuroscience* 6, 1903-1912 (1994); Thompson, et al., *Pain* 62, 219-231 (1995)), a indução de mudanças no crescimento axonal (Lindsay, RM, *J Neurosci.* 8(7), 2394-405 (1988)), a indução da expressão do receptor de bradicinina (Peterson et al., *Neuroscience* 83:161-168 (1998)), a indução de mudanças na expressão de genes responsáveis da condução e activação de nervos tais como canais iónicos (Boettger, et al., *Brain* 125(Pt 2), 252-63 (2002); Kerr, et al., *Neuroreport* 12(14), 3077-8 (2001); Gould, et al., *Brain Res* 854(1-2), 19-29 (2000)), a potenciação do receptor VR1 relacionado com a dor (Chuang, et al., *Nature* 411 (6840), 957-62 (2001); e a provocação de mudanças patológicas em músculos (Foster, et al., *J Pathol* 197(2), 245-55 (2002)). Muitas destas mudanças ocorrem directamente nos neurónios sensoriais que transmitem a dor e aparentemente não dependem da inflamação concomitante. Além disso, existem pelo menos outros dois tipos de células que se sabe que respondem a NGF e que podem estar implicadas em mudanças de sensibilidade ou sensação da dor. Foi relatado que o primeiro deles, o mastócito, responde a NGF com desgranulação (Yan, et al., *Clin. Sci. (Lond)* 80:565-569 (1991)) ou, em outros estudos, provoca ou aumenta a produção ou libertação de mediador em colaboração com outros agentes (Pearce e Thompson, *J. Physiol.* 372:379-393 (1986), Kawamoto, et al., *J. Immunol.* 168:6412-6419 (2002)). Foi demonstrado claramente no rato que as respostas à dor mediadas por NGF estão pelo menos de alguma forma mediadas por mastócitos (Lewin, et al., *Eur. J. Neurosci.* 6:1903-1912 (1994), Woolf, et al., *J. Neurosci.* 16:2716-2723 (1996) embora a possível relevância disto está por demonstrar em seres humanos. Também se sabe que os neurónios simpáticos primários respondem a NGF e que também

estão implicados na sinalização da dor (Aley, et al., Neuroscience 71:1083-1090 (1996)). Está claro que a eliminação de enervação simpática modifica a hiperalgesia normalmente observada em resposta ao tratamento com NGF (Woolf, et al., J. Neurosci. 16: 2716-2723 (1996)).

Vinte e três milhões de pacientes são submetidos cada ano a procedimentos cirúrgicos. A dor está localizada normalmente dentro da proximidade do sítio cirúrgico. A dor pós-cirúrgica pode ter dois aspectos clinicamente importantes, concretamente a dor em repouso, ou dor que é produzida quando o paciente não está em movimento e a dor mecânica que é exacerbada por meio do movimento (tossir/espirrar, sair da cama, fisioterapia, etc.). O principal problema com a gestão da dor pós-cirúrgica no caso de uma cirurgia major é que os fármacos utilizados actualmente têm uma variedade de efeitos secundários proeminentes que atrasam a recuperação, prolongam a hospitalização e submetem certos grupos de pacientes vulneráveis ao risco de complicações graves. A dor pós-cirúrgica, ou dor que é produzida após cirurgia ou lesão traumática é um problema médico grave e com frequência intratável.

Existem duas categorias gerais de medicação para o tratamento da dor, sendo que ambas têm desvantagens. A primeira categoria inclui os fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINE) que são utilizados para tratar a dor ligeira ou moderada, mas cuja utilização terapêutica está limitada por efeitos gastrointestinais não desejáveis tais como erosão gástrica, a formação de úlcera péptica ou a inflamação do duodeno ou do cólon. Os AINE também podem provocar toxicidade renal com a utilização prolongada, e além disso, tal como é descrito a seguir, não são muito eficazes para tratar a dor associada a ou que surge a partir de certos estados, incluindo a dor pós-cirúrgica. A segunda categoria inclui morfina e opióides relacionados

que são utilizados para tratar a dor de moderada a grave, mas cuja utilização terapêutica está limitada devido a efeitos não desejáveis tais como sedação, confusão, obstipação, depressão respiratória, cólica renal, tolerância a utilização prolongada e o risco de dependência. Portanto, são necessários compostos úteis para tratar a dor com menos ou nenhum efeito secundário.

Com frequência a dor é categorizada como "inflamatória", "neuropática" ou "visceral", mas estas etiquetas gerais tradicionais têm problemas inerentes. Implicam identidade ou semelhança mecanicista entre todas as fontes de dor dentro de uma destas categorias muito gerais. De facto, existem muitos tipos diferentes de dor inflamatória e fontes de dor que não são nem inflamatórias nem neuropáticas. Além disso, os tipos de dor que têm um componente inflamatório e/ou são denominados tradicionalmente "inflamatórios" o que não significa que outros aspectos fisiológicos não contribuam para o estado da dor. Por exemplo, tanto a artrose como a cistite intersticial seriam definidas pelos seus nomes como estados inflamatórios estéreis de respectivamente articulações ou a bexiga urinária, mas está claro que as dores associadas a estes dois estados são bastante diferentes de maneira mecanicista entre si. Isto é indicado pelos efeitos variáveis de um tipo dado de medicação analgésica com respeito a estes tipos de dor. A maioria de pacientes com artrose recebe um bom alívio da dor (pelo menos inicialmente) com AINE. No entanto, o tratamento com AINE é completamente ineficaz com a cistite intersticial.

A dor pós-cirúrgica (denominada de maneira intercambiável, dor pós-incisional) é considerada com frequência uma variedade de dor inflamatória. Embora possa haver um componente "inflamatório" com respeito à dor cirúrgica, estão implicados claramente mecanismos adicionais. Por exemplo, durante a cirurgia ou outra lesão,



tanto a vasculatura como os nervos são cortados ou são rasgados. Isto não ocorre num tecido que sofre somente a inflamação. Está claro que o corte de um nervo pode induzir uma actividade contínua que é percebida como dolorosa. Além disso, o corte de vasos sanguíneos conduz a um tecido que é relativamente isquémico, também um estímulo doloroso que não está presente durante a inflamação sozinha.

Os diferentes mecanismos implicados na dor induzida por lesão ou cirúrgica em comparação com a inflamação são exemplificados por meio da farmacologia variável e os substratos anatómicos subjacentes de alívio da dor nos dois estados. Yamamoto, *et al.*, (Brain Res. 909(1-2):138-144 (2001)) demonstraram que a inibição da dipeptidase ácida ligada a N-acetil-alfa (NAALADase) espinal provoca uma atenuação marcada da dor mecânica que acompanha o estímulo inflamatório da injeção de carragenana. No entanto, em experiências paralelas nos quais NAALADase é inibida de um modo idêntico após uma incisão, não houve nenhuma atenuação de dor mecânica. Estas observações demonstram que a bioquímica ou farmacologia subjacente à dor pós-cirúrgica é distinta da subjacente à dor inflamatória. As estruturas anatómicas importantes na modulação da sensação de dor também foram examinadas em estados de dor pós-cirúrgica e outros (Pogatzki, *et al.*, Anesthesiology, 96(5):1153-1160 (May 2002)). As influências descendentes do tronco encefálico, mais especificamente da medula média rostral, são importantes moduladores da hiperalgesia secundária em estados de dor visceral, neuropático e inflamatório gerais. Quando foi lesionada a zona do tronco encefálico, não foi observado nenhuma mudança em nenhuma resposta de dor medida após a incisão. Estes resultados indicam que a hiperalgesia primária e secundária após uma incisão não estão moduladas por meio da influência descendente a partir de RMM. A falta de contribuição de influências facilitadoras descendentes a partir de RMM à hiperalgesia secundária após a incisão do

gastrocnémio suporta a noção de que a dor induzida por incisão envolvia mecanismos diferentes em comparação com a dor inflamatória e neuropática. Além das diferenças óbvias na dor induzida por lesão ou pós-cirúrgica da dor inflamatória, visceral ou neuropático, estes resultados demonstram que os mecanismos implicados na dor pós-cirúrgica (ou dor induzida por lesão) são claramente diferentes de outras dores. Além disso, a utilidade de uma intervenção farmacológica particular (ou outra) no tratamento da dor pós-cirúrgica não pode ser predita testando esse agente ou essa intervenção farmacológicos nos modelos de dor inflamatória, visceral ou neuropático.

O desaparecimento da dor em repouso e a persistência de dor com as actividades e em resposta a estímulos mecânicos no sítio da ferida também estão presentes em pacientes após a cirurgia. (Moiniche, et al., *Acta Anaesthesiol. Scand.* 41:785-9 (1997)). Os estudos sugerem que a dor em repouso e a dor provocada causada por meio de incisões provavelmente são transmitidas por meio de diferentes receptores e/ou diferentes populações de fibras aferentes. De maneira distinta a utilização de anestésicos locais para inibir estas respostas provocadas, estão disponíveis poucos fármacos que reduzem notavelmente a dor com a tosse e o movimento após a cirurgia.

Foi demonstrado que o pré-tratamento com um anestésico local para bloquear a dor durante a incisão experimental previne inicialmente a dor contínua e a hiperalgesia mecânica primária. A dor das incisões também desaparece quando é injectada lidocaína após a lesão. No entanto, a medida que diminui o efeito anestésico local, volta a hiperalgesia primária. Em pacientes, as injeções anestésicas locais realizadas antes da cirurgia são aproximadamente equivalentes para reduzir a dor às injeções realizadas após a cirurgia. (Moiniche, et al., *Anesthesiology* 96:725-41 (2002))

As experiências de estudos clínicos em voluntários humanos e um modelo de incisão pré-clínico coincidem em que a administração de anestesia local antes ou depois da incisão são aproximadamente equivalentes. A activação de neurónios de transmissão de dor central durante a incisão e a sensibilização não são necessárias para comportamentos de dor vários dias depois. Ao invés disso, para incisões, a capacidade de resposta potenciada de neurónios centrais e a dor requerem entrada aferente contínua a partir da incisão. Depois de que diminua qualquer tratamento analgésico prévio à incisão, parece que a ferida cirúrgica pode reiniciar a sensibilização e regenerar as respostas de dor. (Pogatzki, *et al.*, J Neurophysiol 87:721 (2002))

Também foi mapeada a zona de hiperalgesia (incluindo a zona não lesionada) provocada por meio das incisões. A hiperalgesia secundária (hiperalgesia fora da zona lesionada) é uma medida de capacidade de resposta potenciada do sistema nervoso central, isto é, a sensibilização central. Foi observado que a zona de vasodilatação ou vermelhidão (possivelmente um resultado de reflexos de axónio) provocada por meio da incisão era diferente da zona de hiperalgesia. Ao contrário da dor em repouso e a hiperalgesia mecânica primária, a grande zona de hiperalgesia não desenvolveu-se quando a injeção anestésica local foi realizada antes a incisão. Além disso, poderia não ser revertida por meio da injeção anestésica local após a incisão. Em pacientes após a cirurgia, em alguns casos, certos tratamentos reduzem muito a zona de hiperalgesia, mas não modificam muito as medidas clínicas de dor pós-cirúrgica (intensidades de dor e consumo de opióides). Foi demonstrado que a redução da zona de hiperalgesia após colectomia não reduziu muito a dor aguda, mas estava associada a uma redução do número de pacientes que desenvolveram dor residual inclusive até 6 meses após a colectomia. (De Kock, *et al.*, Pain 92:373-80 (2001)).

Foi descrita a utilização do anticorpo anti-NGF para tratar a dor visceral crónica. Veja-se a publicação PCT n.º WO 01/78698. Brennan *et al.* notificam a administração da imunoadesina de TrkA (proteína de fusão a trkA IgG) num modelo de rato de dor pós-cirúrgica. Veja-se Society for Neuroscience Abstracts 24(1-2) 880 (1998).

#### BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção baseia-se na descoberta de que antagonistas de NGF são eficazes no tratamento da dor pós-cirúrgica. O tratamento refere-se a um ou mais aspectos de dor pós-cirúrgica tal como são descritos no presente documento.

Num aspecto, a invenção caracteriza um anticorpo anti-NGF para a utilização no tratamento da dor pós-cirúrgica (denominada de maneira intercambiável "dor pós-traumática" ou "pós-incisional"). Foi demonstrado de acordo com a invenção que antagonistas de NGF podem inibir ou bloquear a dor resultante da dor pós-cirúrgica, incluindo a dor a partir da cirurgia ou a partir de uma ferida traumática ou incisional.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo anti-NGF para a utilização na redução da incidência da dor pós-cirúrgica, melhora da dor pós-cirúrgica, palição da dor pós-cirúrgica; e/ou atraso do desenvolvimento ou evolução da dor pós-cirúrgica num indivíduo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo anti-NGF para a utilização no aumento do limiar de dor num indivíduo que compreende administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NGF.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo anti-NGF para a utilização na potenciação da recuperação de uma ferida traumática induzida por lesão e/ou cirurgia num indivíduo que compreende administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NGF.

Em algumas formas de realização, a dor em repouso é

suprimida, melhorada e/ou prevenida, em algumas formas de realização, a dor induzida mecanicamente (incluindo a dor resultante de movimento) é suprimida, melhorada e/ou prevenida, e em alguma forma de realização, a dor induzida termicamente é suprimida, melhorada e/ou prevenida. Em algumas formas de realização, a dor induzida mecanicamente é suprimida, melhorada e/ou prevenida por meio da administração de um anticorpo anti-NGF. Em algumas formas de realização, a dor em repouso é suprimida, melhorada e/ou prevenida por meio da administração de um anticorpo anti-NGF. Em alguma forma de realização, a dor induzida termicamente é suprimida, melhorada e/ou prevenida por meio da administração de um anticorpo anti-NGF. Em algumas formas de realização, a alodinia (isto é, um aumento de resposta (isto é, um aumento da sensação nociva) a um estímulo normalmente não nocivo)) é suprimida, melhorada e/ou prevenida, e/ou a hiperalgesia (isto é, um aumento de resposta a um estímulo desagradável ou normalmente nocivo) é suprimida, melhorada e/ou prevenida. Ainda em formas de realização adicionais, a alodinia e/ou a hiperalgesia é de natureza térmica ou mecânica (táctil), ou dor em repouso. Em algumas formas de realização, a dor é dor crónica. Em outras formas de realização, a dor está associada ao sítio de incisão, ferida ou traumatismo, e/ou está em, próximo ou proximal ao sítio de incisão, ferida e/ou traumatismo.

Um anticorpo anti-NGF adequado para a utilização nos métodos da invenção é qualquer agente que pode resultar directa ou indirectamente numa redução da actividade biológica de NGF. Por conseguinte, em algumas formas de realização, um anticorpo anti-NGF liga-se a (interage fisicamente com) NGF. Em alguma forma de realização, o anticorpo anti-NGF liga-se a NGF (tal como HNGF) e não liga-se de maneira significativa a neurotrofinas relacionadas, tais como NT-3, NT4/5 e/ou BDNF. Em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF está humanizado

(tal como anticorpo E3 descrito no presente documento). Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é anticorpo E3 (tal como é descrito no presente documento). Em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF compreende um ou mais CDR de anticorpo E3 (tal como um, dois, três, quatro, cinco, ou, em algumas formas de realização, todos os seis CDR de E3). Em outras formas de realização, o anticorpo é humano. Ainda em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF compreende a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada mostrada no quadro 1 (SEQ ID NO: 1) e a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve mostrada no quadro 2 (SEQ ID NO:2). Ainda em outras formas de realização, o anticorpo compreende uma região constante modificada, tal como uma região constante que é imunologicamente inerte, por exemplo, não provoca a lise mediada por complementos, ou não estimula a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC). Em outras formas de realização, a região constante está modificada tal como é descrito em Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; publicação PCT n.º WO9958572; e/ou pedido de patente de RU n.º 9809951.8.

Ainda em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF é um anticorpo que se liga especificamente a NGF (tal como NGF humano). Ainda em outras formas de realização, o anticorpo liga-se essencialmente ao mesmo epítipo 6 de NGF que um anticorpo seleccionado de qualquer um ou mais dos seguintes anticorpos monoclonais de rato: Mab 911, Mab 912 e Mab 938 (veja-se Hongo, et al., Hybridoma 19:215-227 (2000)). Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF liga-se ao receptor trkA. O anticorpo anti-NGF pode ser um anticorpo monoclonal anti-NGF humano (anti-hNGF) que pode ser ligado a hNGF e inibir de maneira eficaz a ligação de hNGF a TrkA humano (hTrkA) e/ou inibir de maneira eficaz a activação do receptor TrkA

humano.

A afinidade de ligação de um anticorpo anti-NGF a NGF (tal como hNGF) pode ser de aproximadamente 0,10 nM a aproximadamente 1,0 nM, de aproximadamente 0,10 nM a aproximadamente 0,80 nM, de aproximadamente 0,15 nM a aproximadamente 0,75 nM e de aproximadamente 0,18 nM a aproximadamente 0,72 nM. Numa forma de realização, a afinidade de ligação é entre aproximadamente 2 pM e 22 pM. Em alguma forma de realização, a afinidade de ligação é aproximadamente 10 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é inferior a aproximadamente 10 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é aproximadamente 0,1 nM ou aproximadamente 0,07 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é inferior a aproximadamente 0,1 nM, ou inferior a aproximadamente 0,07 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é qualquer de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, ou de aproximadamente 50 pM a qualquer de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, ou aproximadamente 40 pM. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é qualquer de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, ou aproximadamente 50 pM, ou inferior a aproximadamente 50 pM. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é inferior a qualquer de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, ou aproximadamente 50 pM. Ainda em outras formas de realização, a afinidade de ligação é aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente

10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM, ou superior a aproximadamente 40 pM. Tal como é bem conhecido na técnica, a afinidade de ligação pode ser expressa como KD, ou constante de dissociação, e um aumento da afinidade de ligação corresponde a uma redução de KD. A afinidade de ligação de anticorpo monoclonal de ratinho anti-NGF 911 (Hongo et al., Hybridoma 19:215-227 (2000) a NGF humano é aproximadamente 10 nM, e a afinidade de ligação de anticorpo anti-NGF humanizado E3 (descrito no presente documento) a NGF humano é aproximadamente 0,07 nM.

O anticorpo anti-NGF pode ser para a administração antes de, durante e/ou após a cirurgia, incisão e/ou ferida que provoca ou está associada à dor pós-cirúrgica. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é administrado antes da cirurgia, incisão ou ferida. A administração de um anticorpo anti-NGF pode ser por meio de qualquer meio conhecido na técnica, incluindo: por via oral, por via intravenosa, por via subcutânea, por via intra-arterial, por via intramuscular, por via intracardíaca, por via intra-espinhal, por via intratorácica, por via intraperitoneal, por via intraventricular, por via sublingual, e/ou por via transdérmica. Em algumas formas de realização, a administração é por meio de um ou mais dos seguintes meios: por via intravenosa, por via subcutânea, por meio de inalação, por via intra-arterial, por via intramuscular, por via intracardíaca, por via intraventricular e por via intraperitoneal. A administração pode ser sistémica, por exemplo por via intravenosa, ou localizada.

Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é administrado numa dose de aproximadamente 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, e em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF é administrado numa dose de aproximadamente 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg de peso corporal.



Em outro aspecto, a invenção apresenta uma composição para tratar e/ou prevenir a dor pós-cirúrgica que compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NGF em combinação com um ou mais excipientes farmacologicamente aceitáveis. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF liga-se especificamente à molécula de NGF.

Em outro aspecto, a invenção apresenta um kit para a utilização em qualquer dos métodos descritos no presente documento. Em algumas formas de realização, o kit compreende qualquer dos anticorpos anti-NGF descritos no presente documento, em combinação com um portador farmacologicamente aceitável. Em outras formas de realização, o kit compreende além disso instruções para a utilização do anticorpo anti-NGF em qualquer dos métodos descritos no presente documento.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 é um gráfico que representa a dor em repouso acumulativa tal como é avaliada 24 horas antes da cirurgia ("avaliação inicial"), 2 horas após a cirurgia ("pós-cirurgia") e 1 e 2 dias após a cirurgia. "Controlo" refere-se a tratamento sem anticorpo anti-NGF, e "911" refere-se a animais tratados com 35 mg/kg de anticorpo anti-NGF 911 (também denominado "Mab 911"). Hongo *et al.*, Hybridoma 19:215-227 (2000). O tratamento com anticorpo anti-NGF reduziu significativamente a dor em repouso pós-cirúrgica.

A figura 2 é um gráfico que representa a dor térmica (hiperalgesia) tal como é avaliada 24 horas antes da cirurgia ("avaliação inicial"), 4 horas após a cirurgia ("pós-cirurgia") e 1 e 2 dias após a cirurgia. "Controlo" refere-se a tratamento sem anticorpo anti-NGF, e "911" refere-se a animais tratados com 35 mg/kg de anticorpo anti-NGF 911. O tratamento com anticorpo anti-NGF reduziu significativamente a hiperalgesia térmica pós-cirúrgica.

A figura 3 é um gráfico que representa a dor mecânica

(hiperalgesia) em resposta à estimulação mecânica tal como é avaliada 24 horas antes da cirurgia ("avaliação inicial"), 3 horas após a cirurgia ("pós-cirurgia") e 1, 2 e 3 dias após a cirurgia. "Controlo" refere-se a tratamento sem anticorpo anti-NGF, e "911" refere-se a animais tratados com anticorpo anti-NGF 911. O tratamento com 7 mg/kg de anticorpo anti-NGF reduziu a dor induzida mecanicamente pós-cirúrgica.

A figura 4 é um gráfico que representa a dor em repouso avaliada 24 horas após a cirurgia e que mostra que o tratamento com 0,02 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,6 mg/kg ou 1 mg/kg de anticorpo anti-NGF humanizado E3 reduziu a dor. "\*" indica uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,5$ ) do controlo negativo.

A figura 5 é um gráfico que representa a dor em repouso avaliada 24 horas após a cirurgia e que mostra que o tratamento com 0,5 mg/kg de anticorpo anti-NGF humanizado E3 reduziu significativamente ( $p < 0,005$ ) a dor em repouso quando foi injectado duas horas após a cirurgia.

A figura 6 é um gráfico que representa a dor em repouso avaliada 24 horas após a cirurgia e que mostra que o tratamento com 5 mg/kg de anticorpo anti-NGF 911 reduziu significativamente a dor em repouso ( $p < 0,02$ ) quando foi injectado 14 dias antes da cirurgia.

A figura 7 é um gráfico que representa a dor em repouso avaliada 24 horas após a cirurgia e que mostra que o tratamento com 5 mg/kg de anticorpo anti-NGF 911 reduziu a dor em repouso quando foi injectado 21 dias antes da cirurgia.

A figura 8 é um gráfico que representa a proporção de feridas intactas presentes após a incisão e o tratamento com solução salina, 1 mg/kg de anticorpo anti-NGF 911, ou o controlo positivo, ceterolac. A proporção de feridas intactas após o tratamento com anticorpo anti-NGF 911 não diferia da proporção de feridas intactas após o tratamento

com solução salina (controle negativo). Portanto, o tratamento com anticorpo anti-NGF não mostrou nenhum efeito sobre a cicatrização de feridas. Pelo contrário, os animais tratados com AINE ceterolac (controle positivo) mostrou uma redução significativa da proporção de feridas intactas.

A figura 9 é um gráfico que representa que o tratamento com o antagonista de NGF de molécula pequena, K252a, reduziu significativamente ( $p < 0,005$ ) a dor em repouso após a cirurgia, quando foi avaliado às três horas ("3H-P-tmt") após o tratamento com K252a. "1H-P-tmt" refere-se a uma hora após o tratamento com K525a.

A figura 10 é um gráfico que compara o tratamento com anticorpo anti-NGF, 911, e o tratamento com um anticorpo controle de isotipo afim. Os animais tratados com 1 mg/kg de anticorpo anti-NGF (911) mostraram uma redução significativa da dor em repouso ( $p < 0,05$ ). Pelo contrário, os animais tratados com 1 mg/kg de um anticorpo controle de isotipo afim contra a proteína amnésica de *Drosophila* apresentaram níveis normais da dor em repouso. Esta experiência demonstrou que o efeito analgésico do anticorpo anti-NGF era específico.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção baseia-se na descoberta de que pode ser utilizada a administração *in vivo* de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de NGF tal como anticorpo monoclonal anti-NGF para prevenir e/ou tratar a dor pós-cirúrgica. A dor pós-cirúrgica foi tratada anteriormente com altas doses de analgésicos opióides. Estes agentes provocam efeitos secundários não desejáveis tais como motilidade gástrica reduzida, sedação, depressão respiratória e cólica renal. Outros agentes contra a dor, tais como AINE, têm sido relativamente insatisfatórios para tratar este tipo de dor. Além disso, sabe-se que alguns AINE inibem a cicatrização de feridas.

A invenção caracteriza a prevenção ou o tratamento da

dor pós-cirúrgica num indivíduo (incluindo um mamífero, tanto humano como não humano) por meio da administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NGF, por exemplo um anticorpo monoclonal anti-NGF humano (anti-hNGF).

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para melhorar, atrasar o desenvolvimento de e/ou prevenir a evolução de dor pós-cirúrgica que compreendem administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF a um indivíduo.

Em algumas formas de realização, a dor em repouso é suprimida, melhorada e/ou prevenida, e em algumas formas de realização, a dor induzida mecanicamente (tal como a dor que resulta do movimento ou outra estimulação mecânica ou táctil) é suprimida, melhorada e/ou prevenida. Em alguma forma de realização, a dor induzida termicamente é suprimida, melhorada e/ou prevenida. Em algumas formas de realização, a dor induzida mecanicamente é suprimida, melhorada e/ou prevenida por meio da administração de um anticorpo anti-NGF. Em algumas formas de realização, a dor em repouso é suprimida, melhorada e/ou prevenida por meio da administração de um anticorpo anti-NGF. Em alguma forma de realização, a dor induzida termicamente é suprimida, melhorada e/ou prevenida por meio da administração de um anticorpo anti-NGF. Em algumas formas de realização, a alodinia é suprimida, melhorada e/ou prevenida, e em algumas formas de realização, a hiperalgesia é suprimida, melhorada e/ou prevenida. Ainda em formas de realização adicionais, a alodinia e/ou hiperalgesia é de natureza térmica ou mecânica (táctil), ou dor em repouso. Em algumas formas de realização, a dor é dor crónica. Em outras formas de realização, a dor está próxima de e/ou é proximal a um ou mais sítios de incisão, ferida ou traumatismo.

A invenção também caracteriza composições e kits para tratar a dor pós-cirúrgica que compreendem um anticorpo anti-NGF, por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-NGF,

para a utilização em qualquer dos métodos proporcionados no presente documento. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é capaz de inibir de maneira eficaz a ligação de NGF a seu(s) receptor(es) TrkA e/ou p75 e/ou é capaz de inibir de maneira eficaz que NGF active o(s) seu(s) receptor(es) TrkA e/ou p75.

#### Técnicas gerais

A prática da presente invenção empregará, a menos que se indique o contrario, técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes) microbiologia, biologia celular, bioquímica e imunologia, que se encontram dentro dos conhecimentos da técnica. Tais técnicas explicam-se de maneira completa na bibliografia, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edição (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather e P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, e D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir e C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller e M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway e P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd e C. Dean,

eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow e D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti e J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

#### Definições

Um "anticorpo" (usado de maneira intercambiável na forma plural) é uma molécula de imunoglobulina que pode ser ligada especificamente a um alvo, tal como um hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., através de pelo menos um sítio de reconhecimento de antigénio, localizado na região variável da molécula de imunoglobulina. Tal como é utilizado no presente documento, o termo engloba não somente anticorpos monoclonais ou policlonais intactos, mas também fragmentos dos mesmos (tal como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), cadeia simples (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão que compreendem uma parte de anticorpo, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, diacorpos, anticorpos lineares, anticorpos de cadeia simples, anticorpos multi-específicos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreende um sítio de reconhecimento de antigénio da especificidade requerida. Um anticorpo inclui um anticorpo de qualquer classe, tal como IgG, IgA ou IgM (ou subclasses das mesmas), e o anticorpo não necessita ser de nenhuma classe em particular. Dependendo da sequência de aminoácidos do anticorpo do domínio constante de suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser designadas a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias destas podem ser divididas adicionalmente em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulina são denominados alfa, delta, épsilon, gama e mi, respectivamente. Conhecem-se bem as estruturas de

subunidades e as configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas.

Um "anticorpo monoclonal" refere-se a uma população de anticorpos homogêneos estando composto o anticorpo por aminoácidos (que são produzidos de maneira natural e que não são produzidos de maneira natural) que estão envolvidos na ligação selectiva de um antigénio. Uma população de anticorpos monoclonais é altamente específica, dirigindo-se contra um único sítio antigénico. A expressão "anticorpo monoclonal" engloba não somente anticorpos monoclonais intactos e anticorpos monoclonais de comprimento completo mas também fragmentos dos mesmos (tal como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), cadeia simples (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão que compreendem uma parte de anticorpo, anticorpos monoclonais humanizados, anticorpos monoclonais quiméricos e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreende um sítio de reconhecimento de antigénio da capacidade de ligação a um antigénio e a especificidade requerida. Não se pretende que se limite com respeito à fonte do anticorpo ou a maneira na qual é realizado (por exemplo, por meio de hibridoma, selecção de fago, expressão recombinante, animais transgénicos, etc.).

Os anticorpos "humanizados" referem-se a uma molécula que tem um sítio de ligação a antigénio que é derivado substancialmente de uma imunoglobulina de uma espécie não humana e a estrutura de imunoglobulina restante da molécula baseia-se na estrutura e/ou sequência de uma imunoglobulina humana. O sítio de ligação a antigénio pode compreender ou domínios variáveis completos fusionados em domínios constantes ou somente as regiões determinantes da complementaridade (CDR) enxertadas em regiões *framework* apropriadas nos domínios variáveis. Os sítios de ligação a antigénio podem ser de tipo selvagem ou modificados por meio de uma ou mais substituições de aminoácidos, por

exemplo, modificados para parecer-se da maneira mais próxima à imunoglobulina humana. Algumas formas de anticorpos humanizados conservam todas as sequências de CDR (por exemplo, um anticorpo de ratinho humanizado que contém todas as seis CDR dos anticorpos de ratinho). Outras formas de anticorpos humanizados têm uma ou mais CDR (uma, dois, três, quatro, cinco, seis) que estão modificadas com respeito ao anticorpo original. Em alguns casos, os resíduos da região framework (FR) ou outros resíduos da imunoglobulina humana estão substituídos pelos correspondentes resíduos não humanos. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não se encontram no anticorpo receptor ou no anticorpo dador.

Tal como é utilizado no presente documento, a expressão "factor de crescimento nervoso" e "NGF" refere-se ao factor de crescimento nervoso e variantes do mesmo que retêm pelo menos parte da actividade de NGF. Tal como é utilizado no presente documento, o NGF inclui todas as espécies de mamífero de NGF de sequência nativa, incluindo ser humano, canino, felino, equino ou bovino.

O "receptor de NGF" refere-se a um polipéptido que se liga por meio de ou está activado por meio de NGF. Os receptores de NGF incluem o receptor TrkA e o receptor p75 de qualquer espécie de mamífero, incluindo, mas não limitado a, ser humano, canino, felino, equino, primata ou bovino.

Um "antagonista de NGF" refere-se a qualquer molécula que bloqueia, suprime ou reduz (incluindo significativamente) a actividade biológica de NGF, incluindo vias a jusante medidas pela sinalização de NGF, tal como ligação a receptor e/ou provocação de uma resposta celular a NGF. O termo "antagonista" não implica um mecanismo específico de qualquer acção biológica, e é considerada que engloba e inclui expressamente todas as possíveis interacções farmacológicas, fisiológicas e



bioquímicas com NGF ou directas ou indirectas, ou se interage com NGF, seu receptor, ou através de outro mecanismo, e suas consequências que podem ser conseguidas por meio de uma variedade de composições diferentes, e quimicamente divergentes. Os antagonistas de NGF exemplares incluem, mas não são limitados a, um anticorpo anti-NGF, uma molécula anti-sense dirigida contra um NGF (incluindo uma molécula anti-sense dirigida frente a um ácido nucleico que codifica NGF), um composto inibidor de NGF, um análogo estrutura de NGF, uma mutação negativa dominante de um receptor TrkA que se liga a um NGF, uma imunoadesina de TrkA, um anticorpo anti-TrkA, um anticorpo anti-p75 e um inibidor de quinase. Para o propósito da presente invenção, será entendido explicitamente que o termo "antagonista" engloba todos os termos, títulos, características e estados funcionais identificados anteriormente por meio dos quais o próprio NGF, uma actividade biológica de NGF (incluindo, mas não limitado a sua capacidade para mediar qualquer aspecto de dor pós-cirúrgica), ou as consequências da actividade biológica, estão substancialmente anulados, reduzidos ou neutralizados em qualquer grau significativo. Em algumas formas de realização, um antagonista de NGF (por exemplo, um anticorpo) liga-se a (interage fisicamente com) NGF, liga-se a um receptor de NGF (tal como receptor trkA e/ou receptor p75), reduz (impede e/ou bloqueia) a sinalização de receptor de NGF a jusante, e/ou inibe (reduz) a síntese, produção ou libertação de NGF. Em outras formas de realização, um antagonista de NGF liga-se a NGF e evita a dimerização do receptor TrkA e/ou a autofosforilação de TrkA. Em outras formas de realização, um antagonista de NGF inibe ou reduz a síntese e/ou produção (libertação) de NGF. São proporcionados no presente documento exemplos de tipos de antagonistas de NGF.

Tal como é utilizado no presente documento, um

"anticorpo anti-NGF" refere-se a um anticorpo que pode ser ligado a NGF e inibe a actividade biológica de NGF e/ou vias(s) a jusante mediada(s) por meio da sinalização de NGF.

Uma "imunoadesina de TrkA" refere-se a uma molécula quimérica solúvel que compreende um fragmento de um receptor TrkA, por exemplo, o domínio extracelular de um receptor TrkA e uma sequência de imunoglobulina, que conserva a especificidade de ligação do receptor TrkA.

A "actividade biológica" de NGF refere-se geralmente à capacidade de ser ligado a receptores de NGF e/ou de activar as vias de sinalização do receptor de NGF. Sem limitação, uma actividade biológica inclui qualquer uma ou mais das seguintes: a capacidade de ser ligado a um receptor de NGF (tal como p75 e/ou TrkA); a capacidade de promover a autofosforilação e/ou dimerização do receptor TrkA; a capacidade de activar uma via de sinalização do receptor de NGF; a capacidade de promover a diferenciação, proliferação, sobrevivência, crescimento celular e outras mudanças na fisiologia celular, incluindo (no caso de neurónios, que inclui neurónio periférico e central) mudança na morfologia neuronal, sinaptogénese, função sináptica, libertação e regeneração após dano de neurotransmissores e/ou neuropeptídeos; e a capacidade de mediar a dor pós-cirúrgica.

O termo "epítopo" é utilizado para referir-se a sítios de ligação para anticorpos (monoclonais ou policlonais) em antígenos de proteína.

Tal como é utilizado no presente documento, "tratamento" é um enfoque para obter resultados clínicos desejados ou benéficos. Para os propósitos desta invenção, os resultados clínicos desejados ou benéficos incluem, mas não são limitados a, um ou mais dos seguintes: melhora de qualquer aspecto da dor incluindo a diminuição da gravidade, alívio de um ou mais sintomas associados a dor

pós-cirúrgica incluindo qualquer aspecto de dor pós-cirúrgica (tal como dor em repouso e/ou dor induzida mecanicamente, reduzindo a duração da dor, e/ou a redução da sensação de ou sensibilidade à dor).

Uma "quantidade eficaz" é uma quantidade suficiente para efectuar resultados clínicos desejados ou benéficos incluindo alívio ou redução da dor. Para os propósitos desta invenção, uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF é uma quantidade suficiente para tratar, melhorar, reduzir a intensidade de ou evitar a dor pós-cirúrgica. Em algumas formas de realização, a "quantidade eficaz" pode reduzir a dor em estado de repouso (dor em repouso) ou dor induzida mecanicamente (incluindo dor após movimento), ou ambos, e pode ser administrada antes, durante e/ou após uma incisão, um corte, um rasgo ou uma lesão. Em alguma forma de realização, a "quantidade eficaz" é uma quantidade suficiente para atrasar o desenvolvimento de dor pós-cirúrgica.

A "redução de incidência" de dor significa qualquer redução da gravidade (que pode incluir a redução necessária de e/ou quantidade de (por exemplo, exposição a) outros fármacos e/ou terapias geralmente usadas para estes estados, incluindo, por exemplo, opiáceos), duração e/ou frequência (incluindo, por exemplo, atraso ou aumento do tempo até a dor pós-cirúrgica num indivíduo). Tal como os peritos na especialidade entendem, os indivíduos podem variar em quanto a suas respostas ao tratamento, e como tal, por exemplo, um "método de redução da incidência de dor pós-cirúrgica num indivíduo" reflecte a administração do antagonista de NGF descrito no presente documento baseando-se numa expectativa razoável de que tal administração pode provocar provavelmente uma redução da incidência deste tipo nesse indivíduo particular.

A "melhora" da dor pós-cirúrgica ou de um ou mais sintomas da dor pós-cirúrgica significa uma diminuição ou

melhora de um ou mais sintomas de uma dor pós-cirúrgica quando é comparada com a não administração de um antagonista de NGF. A "melhora" também inclui o encurtamento ou redução da duração de um sintoma.

A "paliação" da dor pós-cirúrgica ou de um ou mais sintomas de uma dor pós-cirúrgica significa a diminuição do grau de uma ou mais manifestações clínicas não desejáveis da dor pós-cirúrgica num indivíduo ou população de indivíduos tratados com um antagonista de NGF de acordo com a invenção.

Tal como é utilizado no presente documento, o "atraso" do desenvolvimento da dor pós-cirúrgica significa adiar, impedir, desacelerar, retardar, estabilizar e/ou pospor a evolução da dor pós-cirúrgica. Este atraso pode ser de durações de tempo variáveis Dependendo da história da doença e/ou os indivíduos que estão a ser tratados. Tal como é evidente para um perito na especialidade, um atraso suficiente ou significativo pode, em efeito, englobar a prevenção, em que o indivíduo não desenvolve dor pós-cirúrgica. Um método que "atrasa" o desenvolvimento do sintoma é um método que reduz a probabilidade de desenvolver o sintoma num quadro de tempo dado e/ou reduz o grau dos sintomas num quadro de tempo dado, quando é comparada com o não utilização do método. Tais comparações baseiam-se normalmente em estudos clínicos, utilizando um número de sujeitos estatisticamente significativo.

O "desenvolvimento" ou a "evolução" de dor pós-cirúrgica significa manifestações iniciais e/ou evolução resultante do distúrbio. O desenvolvimento de dor pós-cirúrgica pode ser detectada e ser avaliada utilizando técnicas clínicas convencionais que são bem conhecidos na técnica. No entanto, o desenvolvimento também refere-se à evolução que pode não ser detectada. Para o propósito desta invenção, o desenvolvimento ou a evolução refere-se ao curso biológico dos sintomas. O "desenvolvimento" inclui a

existência, recidiva e aparição. Tal como é utilizado no presente documento "aparição" ou "existência" de dor pós-cirúrgica inclui a aparição inicial e/ou recidiva.

Um "indivíduo" é um vertebrado, preferentemente um mamífero, mais preferentemente um ser humano. Os mamíferos incluem, mas não são limitados a, animais de granja, animais desportivos, animais domésticos, primatas, cavalos, cães, gatos, ratinhos e ratos.

O "dor pós-cirúrgica" (denominado de maneira intercambiável "dor pós-traumática" ou "pós-incisional") refere-se a dor que surge ou resulta de um traumatismo externo tal como um corte, uma punção, uma incisão, um rasgo ou uma ferida no tecido de um indivíduo (incluindo o que surge de todos os procedimentos cirúrgicos, ou invasivos ou não invasivos). Tal como é utilizado no presente documento, a "dor pós-cirúrgica" não inclui a dor que é produzida sem um traumatismo físico externo. Em algumas formas de realização, a dor pós-cirúrgica é interna ou externa, e a ferida, o corte, o traumatismo, o rasgo ou a incisão pode ser produzida de maneira acidental (tal como com uma ferida traumática) ou de maneira deliberada (tal como com uma incisão cirúrgica). Tal como é utilizado no presente documento, o "dor" inclui a nocicepção e a sensação da dor, e a dor pode ser avaliada de maneira objectiva e subjectiva, utilizando pontuações de dor e outros métodos bem conhecidos na técnica. A dor pós-cirúrgica, tal como é utilizado no presente documento, inclui alodinia (isto é, um aumento de resposta a um estímulo não nocivo) e hiperalgesia (isto é, um aumento de resposta a um estímulo normalmente nocivo ou desagradável), que por sua vez pode ser de natureza térmica ou mecânica (táctil). Em algumas formas de realização, a dor caracteriza-se pela sensibilidade térmica, sensibilidade mecânica e/ou dor em repouso. Em algumas formas de realização, a dor pós-cirúrgica compreende a dor induzida

mecanicamente ou a dor em repouso. Em outras formas de realização, a dor pós-cirúrgica compreende a dor em repouso. A dor pode ser dor primária ou secundária, tal como é bem conhecido na técnica.

O "dor em repouso" refere-se a dor que é produzida inclusive enquanto o indivíduo está em repouso ao contrário de, por exemplo, a dor que é produzida quando o indivíduo se move ou está submetido a outros estímulos mecânicos (por exemplo, cotoveladas ou picadas).

O "dor induzida mecanicamente" (denominado de maneira intercambiável dor mecanosensorial) refere-se a dor induzida por meio de um estímulo mecânico, tal como a aplicação de peso numa superfície, estímulo táctil e estimulação provocada ou associada a o movimento (incluindo tosse, deslocamento do peso, etc.).

A recuperação da cirurgia, traumatismo ou ferida é "potenciada" quando um aspecto da cirurgia, traumatismo ou ferida é melhorado (em comparação com a recuperação da cirurgia, traumatismo ou ferida sem a administração de um antagonista de NGF). Por exemplo, a presença e/ou intensidade de efeitos secundários não desejados (tais como efeitos secundários associados à utilização de calmantes convencionais (por exemplo, opióide)) pode ser reduzida e/ou eliminada em presença de um antagonista de NGF com respeito à presença e/ou intensidade de tais efeitos secundários em ausência de um antagonista de NGF. Este potenciamento está indicado por meio da administração de um antagonista de NGF e não significa sugerir que uma comparação deste tipo (administração de uma antagonista de NGF frente a não administração) tenha que ser realizada e provada com respeito a nenhum indivíduo dado.

#### Métodos da invenção

Com respeito a todos os métodos descritos no presente documento, a referência a um anticorpo anti-NGF também inclui composições que compreendem um ou mais destes

agentes. Estas composições podem compreender além disso excipientes adequados, tais como excipientes (portadores) farmacêuticamente aceitáveis incluindo tampões, que são bem conhecidos na técnica. A presente invenção pode ser utilizada sozinha ou em combinação com outros métodos de tratamento convencionais.

#### *Métodos para prevenir ou tratar a dor pós-cirúrgica*

A presente invenção é útil para tratar, atrasar o desenvolvimento de e/ou prevenir a dor pós-cirúrgica em indivíduos que incluem todos os mamíferos, tanto humanos como não humanos. Além disso, a presente invenção é útil em indivíduos que têm uma ferida incisional no tecido ou um corte, uma punção ou um rasgo, ou interna ou externa. Uma ferida incisional deste tipo pode ser produzida de maneira acidental tal como o caso de ferida traumática ou de maneira deliberada tal como o caso de cirurgia.

Por conseguinte, num aspecto a invenção proporciona um anticorpo anti-NGF para a utilização no tratamento da dor pós-cirúrgica num indivíduo. Em algumas formas de realização, a dor pós-cirúrgica compreende um ou mais de: alodinia, hiperalgesia, dor induzida mecanicamente, dor induzida termicamente, dor induzida mecanicamente ou dor em repouso. Em algumas formas de realização, a dor pós-cirúrgica compreende dor induzida mecanicamente e/ou dor em repouso. Foi observado, por exemplo, que anticorpos anti-NGF aliviam ambos destes aspectos. Em outras formas de realização, a dor pós-cirúrgica compreende dor em repouso. A dor pode ser dor primária e/ou secundária. Em outras formas de realização, a alodinia é suprimida, melhorada e/ou prevenida, e em algumas formas de realização, a hiperalgesia é suprimida, melhorada e/ou prevenida. Ainda em formas de realização adicionais, a alodinia e/ou hiperalgesia é de natureza térmica ou mecânica (táctil) (ou ambas), ou dor em repouso. Em algumas formas de realização, a dor é dor crónica. Em outras formas de realização, a dor

está próxima de e/ou é proximal a um ou mais sítios de incisão, ferida ou traumatismo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona o anticorpo anti-NGF para a utilização na prevenção, melhora e/ou prevenção do desenvolvimento ou evolução da dor pós-cirúrgica.

Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF, é administrado antes da cirurgia (em alguma forma de realização, antes da actividade que provavelmente resulte numa ferida e/ou um traumatismo externo). Por exemplo, o anticorpo anti-NGF pode ser administrado 30 minutos, uma hora, 5 horas, 10 horas, 15 horas, 24 horas ou inclusive mais, tal como 1 dia, vários dias, ou inclusive uma semana, duas semanas, três semanas, ou mais antes da actividade com um risco de traumatismo, ferida ou incisão, ou antes de uma intervenção cirúrgica (em alguma forma de realização, que provavelmente resulta num traumatismo, uma ferida ou incisão). Em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF é administrado durante e/ou após a cirurgia ou actividade que provavelmente resulta num traumatismo ou uma ferida externos. Numa forma de realização, o anticorpo anti-NGF é administrado 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, ou mais, após cirurgia, ferida ou traumatismo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para aumentar o limiar de dor. Tal como é utilizado no presente documento, "aumentar o limiar de dor" refere-se a uma redução, diminuição e/ou minimização da dor associado à cirurgia, incisão, traumatismo ou ferida (incluindo uma redução, diminuição e/ou minimização de percepção subjectiva da dor).

Ainda em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para potenciar a recuperação da cirurgia (assim como também potenciar a recuperação de ferida, lesão traumática e/ou incisão).



Aprecia-se que embora seja feita referência geralmente no presente documento ao tratamento ou prevenção da dor pós-cirúrgica, o anticorpo anti-NGF pode ser administrado antes de um evento ou estado(s) com um aumento de risco de traumatismo (tal como um impacto), lesão ou ferida externos. Tal como um perito na especialidade entende, um evento ou estado com um aumento de risco de traumatismo, lesão ou ferida externos engloba actividades desportivas, combate e/ou vocações perigosas.

O diagnóstico ou a avaliação da dor está bem estabelecido na técnica. A avaliação pode ser realizada baseando-se na medida objectivo, tal como a observação do comportamento tal como uma reacção a estímulos, expressões faciais e similares. A avaliação pode estar baseada também em medições subjectivas, tal como a caracterização da dor do paciente utilizando diversas escalas de dor. Veja-se, por exemplo, Katz et al, Surg Clin North Am. (1999) 79 (2):231-52; Caraceni et al. J Pain Symptom Manage (2002) 23(3):239-55.

O alívio da dor também pode ser caracterizado pelo transcurso de tempo do alívio. Por conseguinte, em algumas formas de realização, o alívio da dor é observado de maneira subjectiva ou objectiva após 1, 2, ou algumas horas (e em algumas formas de realização, máximos em aproximadamente 12-18 horas). Em outra forma de realização, o alívio da dor é observado de maneira subjectiva ou objectiva em 24, 36, 48, 60, 72 ou mais horas após a cirurgia (ou acontecimento associado a ferida ou traumatismo).

#### Antagonistas de NGF

A invenção utiliza um anticorpo anti-NGF. Um antagonista de NGF refere-se a qualquer molécula que bloqueia, suprime ou reduz (incluindo significativamente) a actividade biológica de NGF, incluindo vias a jusante mediadas por meio da sinalização de NGF, tal como ligação a

receptor e/ou provocação de uma resposta celular a NGF. O termo "antagonista" não implica um mecanismo específico de qualquer acção biológica, e é considerada que inclui e engloba expressamente todas as possíveis interacções farmacológica, fisiológica e bioquímica com NGF e suas consequências que podem ser conseguidas por meio de uma variedade de composições diferentes e quimicamente divergentes. São descritos no presente documento antagonistas de NGF distintos de um anticorpo anti-NGF para propósitos comparativos e incluem uma molécula anti-sense dirigida frente a NGF (incluindo uma molécula anti-sense dirigida frente a um ácido nucleico que codifica NGF), uma molécula anti-sense dirigida frente a um receptor de NGF (tal como receptor TrkA e/ou receptor p75) (incluindo uma molécula anti-sense dirigida a um ácido nucleico que codifica TrkA e/ou p75), um composto inibidor de NGF, um análogo estrutural de NGF, uma mutação negativa dominante de um receptor TrkA que se liga a um NGF, uma imunoadesina de TrkA, um anticorpo anti-TrkA, um anticorpo anti-p75, e um inibidor de quinase. Para o propósito da presente invenção, se entenderá de maneira explícita que o termo "antagonista" engloba todos os termos, títulos e características e estados funcionais identificados anteriormente, por meio dos quais o próprio NGF, uma actividade biológica de NGF (incluindo mas não limitado a sua capacidade para mediar qualquer aspecto da dor pós-cirúrgica), ou as consequências da actividade biológica, são anuladas, reduzidas ou neutralizadas substancialmente em qualquer grau significativo. Em alguma forma de realização, o anticorpo anti-NGF liga-se a NGF (tal como hNGF) e não liga-se de maneira significativa a neurotrofinas relacionadas, tais como NT-3, NT4/5 e/ou BDNF. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF não está associado a uma resposta imune adversa. Ainda em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF está

humanizado (tal como anticorpo E3 descrito no presente documento). Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é anticorpo E3 (tal como é descrito no presente documento). Em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF compreende um ou mais CDR(s) de anticorpo E3 (tal como um, dois, três, quatro, cinco ou, em algumas formas de realização, todos as seis CDR de E3). Em outras formas de realização, o anticorpo é humano. Ainda em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF compreende a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada mostrada no quadro 1 (SEQ ID NO:1) e a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve mostrada no quadro 2 (SEQ ID NO:2). Ainda em outras formas de realização, o anticorpo compreende uma região constante modificada, tal como uma região constante que é imunologicamente inerte, por exemplo, não provoca a lise mediada por complementos, ou não estimula a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC). Em outras formas de realização, a região constante está modificada tal como é descrito em Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; publicação PCT n.º WO9958572; e/ou pedido de patente do Reino Unido n.º 9809951.8.

#### Anticorpos anti-NGF

Um anticorpo anti-NGF deveria mostrar qualquer uma ou mais das seguintes características: (a) ser ligado a NGF; (b) inibir a actividade biológica de NGF ou vias a jusante mediadas por meio da função de sinalização de NGF; (c) prevenir, melhorar ou tratar qualquer aspecto da dor pós-cirúrgica; (d) bloquear ou reduzir a activação do receptor de NGF (incluindo a autofosforilação e/ou dimerização do receptor TrkA); (e) aumentar a depuração de NGF; (f) inibir (reduzir) a síntese, produção ou libertação de NGF; (g) potenciar a recuperação a partir de cirurgia, ferida ou traumatismo.

Conhecem-se na técnica anticorpos anti-NGF, veja-se

por exemplo, as publicações PCT n.ºs WO 01/78698, WO 01/64247, as patentes dos Estados Unidos n.ºs 5.844.092, 5.877.016 e 6.153.189; Hongo et al., Hybridoma, 19:215-227 (2000); Cell. Molec. Biol. 13: 559-568 (1993); n.ºs de registo de GenBank U39608, U39609, L17078 ou L17077.

Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é um anticorpo monoclonal anti-NGF de ratinho humanizado denominado "E3", que compreende a região constante de IgG2a de cadeia pesada que contem as seguintes mutações: A330P331 a S330S331 (numeração de aminoácidos com referência à sequência de IgG2a de tipo selvagem; veja-se Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624); a região constante kappa de cadeia leve humana; e as regiões variáveis de cadeia leve e pesada humanas apresentadas nos quadros 1 e 2.

**Quadro 1: Região variável de cadeia pesada**

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDY  
NSAVKSRVTISK-

DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQGLTVTS (SEQ ID NO:1).

**Quadro 2: Região variável de cadeia leve**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFSHSGVP  
SRFSGSGS- GTDFTFTISLQPEDATYYCQQEHT LPYTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO:2).

Os seguintes polinucleótidos que codificam a região variável da cadeia pesada ou a região variável da cadeia leve foram depositados no ATCC em 8 de Janeiro de 2003:

<b>Material</b>		<u>n.º de registo</u> ATCC	<u>Data de</u> depósito
Vector Eb.911.3E	Região V da cadeia leve de E3	PTA-4893	8 de Janeiro de 2003
Vector Eb.pur.911.3E	Região V da cadeia leve de E3	PTA-4894	8 de Janeiro de 2003

Vector Db.911.3E	Região V da cadeia pesada de E3	PTA-4895	8 de Janeiro de 2003
---------------------	------------------------------------	----------	----------------------------

O vector Eb.911.3E é um polinucleótido que codifica a região variável da cadeia leve mostrada no quadro 2; o vector Eb.pur.911.3E é um polinucleótido que codifica a região variável da cadeia leve mostrada no quadro 2 e o vector Db.911.3E é um polinucleótido que codifica a região variável de cadeia pesada mostrada no quadro 1.

Em outra forma de realização, o anticorpo anti-NGF compreende uma ou mais CDR(s) de anticorpo E3 (tal como uma, dois, três, quatro, cinco ou, em algumas formas de realização, todas as seis CDR de E3). A determinação das regiões CDR está dentro dos conhecimentos da técnica.

Os anticorpos úteis na presente invenção podem englobar anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc, etc.), anticorpos quiméricos, anticorpos biespecíficos, anticorpos heteroconjugados, cadeia simples (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão que compreendem uma parte de anticorpo, anticorpos humanizados, e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreende um sítio de reconhecimento a antigénio da especificidade requerida, incluindo variantes de glicosilação de anticorpos, variantes de sequência de aminoácidos de anticorpos, e anticorpos modificados covalentemente. Os anticorpos podem ser murinos, de rato, humanos, ou qualquer outra origem (incluindo anticorpos humanizados ou quiméricos). Para os propósitos desta invenção, o anticorpo reage com NGF de maneira que inibe o NGF e/ou vias a jusante mediadas por meio da função de sinalização de NGF. Numa forma de realização, o anticorpo é um anticorpo humano que reconhece um ou mais epítomos em NGF humano. Em outra forma de realização, o anticorpo é um

anticorpo de ratinho ou rato que reconhece um ou mais epítomos em NGF humano. Em outra forma de realização, o anticorpo reconhece um ou mais epítomos num NGF seleccionado do grupo que consiste em: primata, canino, felino, equino e bovino. Em outras formas de realização, o anticorpo compreende uma região constante modificada, tal como uma região constante que é imunologicamente inerte, por exemplo, não provoca a lise mediada por complementos, ou não estimula a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC). A actividade de ADCC pode avaliado utilizando métodos revelados na patente dos Estados Unidos n.º 5.500.362. Em outras formas de realização, a região constante está modificada tal como é descrito em Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; publicação PCT n.º WO9958572; e/ou pedido de patente do Reino Unido n.º 9809951.8.

A afinidade de ligação de um anticorpo anti-NGF a NGF (tal como hNGF) pode ser de aproximadamente 0,10 nM a aproximadamente 0,80 nM, de aproximadamente 0,15 nM a aproximadamente 0,75 nM e de aproximadamente 0,18 nM a aproximadamente 0,72 nM. Numa forma de realização, a afinidade de ligação é entre aproximadamente 2 pM e 22 pM. Em alguma forma de realização, a afinidade de ligação é aproximadamente 10 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é inferior a aproximadamente 10 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é aproximadamente 0,1 nM ou aproximadamente 0,07 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é inferior a aproximadamente 0,1 nM, ou inferior a aproximadamente 0,07 nM. Em outras formas de realização, a afinidade de ligação é qualquer de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM ou aproximadamente 50 pM a qualquer de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM,

aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM ou aproximadamente 40 pM. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é qualquer de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM ou aproximadamente 50 pM, ou inferior a aproximadamente 50 pM. Em algumas formas de realização, a afinidade de ligação é inferior a qualquer de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM ou aproximadamente 50 pM. Ainda em outras formas de realização, a afinidade de ligação é aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM, ou superior a aproximadamente 40 pM.

Um modo de determinar a afinidade de ligação de anticorpos a NGF é por meio da medição da afinidade de ligação do fragmento Fab monofuncional do anticorpo. Para obter fragmentos Fab monofuncionais, pode ser clivado um anticorpo (por exemplo, IgG) com papaína ou ser expressa de maneira recombinante. A afinidade de um fragmento Fab anti-NGF de um anticorpo pode ser determinada por meio de ressonância de plasmão superficial (sistema de ressonância de plasmão superficial (SPR) BIAcore3000TM, BIAcore, INC, Piscaway NJ). Podem ser activados chips CM5 com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fabricante. Pode ser diluído NGF humano (ou qualquer outro NGF) em acetato de sódio 10 mM pH 4,0 e ser injectado sobre o chip activado a uma concentração de 0,005 mg/ml. Com a utilização de tempo de fluxo variável pelos canais do chip individuais, podem ser conseguidos dois intervalos de densidade de antígeno: 100-200 unidades de resposta (UR) para estudos cinéticos detalhados e 500-600 UR para ensaios

de selecção. O chip pode ser bloqueado com etanolamina. Os estudos de regeneração mostraram que uma mistura de tampão de eluição de Pierce (produto n.º 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) e NaCl 4 M (2:1) elimina de maneira eficaz o Fab ligado mantendo a actividade de hNGF no chip durante mais de 200 injeções. É utilizado tampão HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, tensioactivo P29 a 0,005%) como tampão de corrida para os ensaios de BIAcore. São injectadas diluições em série (0,1-10x KD estimada) de amostras de Fab purificada durante 1 min. a 100 l/min. e são permitidos tempos de dissociação de até 2 h. As concentrações das proteínas Fab são determinadas por meio de ELISA e/ou eletroforese SDS-PAGE utilizando um Fab de concentração conhecida (tal como é determinado por meio de análise de aminoácidos) como padrão. São obtidas taxas de associação ( $k_{on}$ ) e taxas de dissociação ( $k_{off}$ ) cinéticas simultaneamente ajustando os dados a um modelo de ligação de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) utilizando o programa BIAevaluation. São calculados valores de constante de dissociação ( $K_D$ ) de equilíbrio como  $k_{off}/k_{on}$ . Este protocolo é adequado para a utilização para determinar a afinidade de ligação de um anticorpo a qualquer NGF, incluindo NGF humano, NGF de outro vertebrado (em algumas formas de realização, mamífero) (tal como NGF de ratinho, NGF de rato, NGF de primata), assim como também para a utilização com outras neurotrofinas, tais como as neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5 e/ou BDNF.

Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a NGF humano, e não liga-se de maneira significativa a um NGF de outra espécie de vertebrados (em alguma forma de realização, mamífero). Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a NGF humano assim como também a um ou mais NGF de outra espécie de vertebrados (em algumas formas



de realização, mamífero). Ainda em outras formas de realização, o anticorpo liga-se a NGF e não reage de maneira cruzada significativamente com outras neurotrofinas (tais como as neurotrofinas relacionadas, NT3, NT4/5 e/ou BDNF). Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a NGF assim como também a pelo menos outra neurotrofina. Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a uma espécie de mamífero de NGF, tal como cavalo ou cão, mas não liga-se de maneira significativa a NGF de outra espécie de mamífero.

O(s) epítopo(s) pode(m) ser contínuo(s) ou descontínuo(s). Numa forma de realização, o anticorpo liga-se essencialmente aos mesmos epítopos de hNGF que um anticorpo seleccionado do grupo que consiste em MAb 911, MAb 912 e MAb 938 tal como é descrito em Hongo *et al.*, Hybridoma, 19:215-227 (2000). Num aspecto da descrição, o anticorpo liga-se essencialmente ao mesmo epítopo de hNGF que MAb 911. Ainda em outra forma de realização, o anticorpo liga-se essencialmente ao mesmo epítopo que MAb 909. Hongo *et al.*, citado anteriormente. Por exemplo, o epítopo pode compreender um ou mais de: resíduos K32, K34 e E35 dentro da região variável 1 (aminoácidos 23-35) de hNGF; resíduos F79 e T81 dentro da região variável 4 (aminoácidos 81-88) de hNGF; resíduos H84 e K88 dentro da região variável 4; resíduo R103 entre a região variável 5 (aminoácidos 94-98) de hNGF e a extremidade C-terminal (aminoácidos 111-118) de hNGF; resíduo E11 dentro da região pré-variável 1 (aminoácidos 10-23) de hNGF; Y52 entre a região variável 2 (aminoácidos 40-49) de hNGF e a região variável 3 (aminoácidos 59-66) de hNGF; resíduos L112 e S113 dentro da extremidade C-terminal de hNGF; resíduos R59 e R69 dentro da região variável 3 de hNGF; ou resíduos V18, V20 e G23 dentro da região pré-variável 1 de hNGF. Além disso, um epítopo pode compreender uma ou mais da região variável 1, região variável 3, região variável 4, região

variável 5, a região da extremidade N-terminal e /ou a extremidade C-terminal de hNGF. Ainda em outra forma de realização, o anticorpo reduz significativamente a acessibilidade do solvente do resíduo R103 de hNGF. Entende-se que embora os epítomos descritos anteriormente estão relacionados com NGF humano, um perito pode alinhar as estruturas de NGF humano com o NGF de outra espécie e identificar prováveis homólogos a estes epítomos.

Num aspecto, podem ser preparados anticorpos (por exemplo, humanos, humanizados, de ratinho, quiméricos), que podem inibir o NGF, utilizando imunogénios que expressam a sequência parcial ou de comprimento completo de NGF. Em outro aspecto, pode ser utilizado um imunogénio que compreende uma célula que sobre-expressa o NGF. Outro exemplo de um imunogénio que pode ser utilizado é a proteína de NGF que contém NGF de comprimento completo ou uma parte da proteína de NGF.

Os anticorpos anti-NGF podem ser preparados por meio de qualquer método conhecido na técnica. A via e o programa de imunização do animal hospedeiro concordam geralmente com técnicas estabelecidas e convencionais para a estimulação e produção de anticorpos, tal como é descrito adicionalmente no presente documento. Conhecem-se na técnica técnicas gerais para a produção de anticorpos humanos e de ratinho e são descritos no presente documento.

Contempla-se que qualquer sujeito mamífero incluindo seres humanos ou células que produzem anticorpos do mesmo pode ser manipulado para servir como base de produção de linhas de células de hibridoma de mamífero, incluindo ser humano. Normalmente, o animal hospedeiro é inoculado por via intraperitoneal, por via intramuscular, por via oral, por via subcutânea, por via intraplantar e/ou por via intradérmica com uma quantidade de imunogénio, incluindo tal como é descrito no presente documento.

Podem ser preparados hibridomas a partir dos

linfócitos e células de mieloma imortalizadas utilizando a técnica geral de hibridação de células somáticas de Kohler, B. e Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497 ou como modificada por Buck, D. W., et al., *In Vitro*, 18:377-381 (1982). Podem ser utilizadas na hibridação linhas de mieloma disponíveis, incluindo, mas não limitado a X63-Ag8.653 e as do Salk Institute, Cell Distribution Center, São Diego, Calif., EUA. Geralmente, a técnica implica fundir células de mieloma e células linfóides utilizando um fusogénio tal como polietilenoglicol, ou por meio de meios eléctricos bem conhecidos para os peritos na especialidade. Após a fusão, o meio de fusão é separado das células e são crescidas num meio de crescimento selectivo, tal como meio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), para eliminar células estaminais não hibridizadas. Qualquer dos meios descritos no presente documento, complementados com ou sem soro, podem ser utilizados para cultivar hibridomas que secretam anticorpos monoclonais. Como outra alternativa à técnica de fusão celular, podem ser utilizadas células B imortalizadas de VEB para produzir os anticorpos monoclonais anti-NGF da presente invenção. Os hibridomas são expandidos e subclonados, se é desejado, e os sobrenadantes são submetidos a ensaio para determinar a actividade anti-imunogénio por meio de procedimentos de imunoensaio convencionais (por exemplo, radioimunoanálise, imunoensaio enzimático ou imunoensaio de fluorescência). Os hibridomas que podem ser utilizados como fonte de anticorpos englobam todos os derivados, células de progénie dos hibridomas mãe que produzem anticorpos monoclonais específicos para NGF, ou uma parte dos mesmos. Os hibridomas que produzem tais anticorpos podem ser crescidos *in vitro* ou *in vivo* utilizando procedimentos conhecidos. Os anticorpos monoclonais podem ser isolados dos meios de cultura ou fluidos corporais, por meio de procedimentos de purificação de imunoglobulinas convencionais tais como

precipitação em sulfato de amónio, eletroforese em gel, diálise, cromatografia e ultrafiltração, se é desejado. A actividade não desejada, se está presente, pode ser eliminada, por exemplo, fazendo correr a preparação sobre adsorventes preparados do imunogénio ligado a uma fase sólida e separando por eluição ou libertação os anticorpos desejados do imunogénio. A imunização de um animal hospedeiro com um NGF humano, ou um fragmento que contém a sequência de aminoácidos alvo conjugada a uma proteína que é imunógena na espécie que a serem imunizadas, por exemplo, hemocianina do molusco *Megathura crenulata* (nome comum em inglês *keyhole limpet*), albumina sérica, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja utilizando um agente bifuncional ou derivatizante, por exemplo éster de maleimidobenzoilsulfosuccinimida (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico,  $\text{SOCl}_2$  ou  $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , em que R e  $\text{R}_1$  são grupos alquilos diferentes, pode proporcionar uma população de anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais).

Se é desejado, pode ser sequenciado o anticorpo anti-NGF (monoclonal ou policlonal) de interesse e então a sequência de polinucleótidos pode ser clonada num vector para a expressão ou propagação. A sequência que codifica o anticorpo de interesse pode ser mantida no vector numa célula hospedeiro e então pode ser expandida a célula hospedeiro e ser congelada para sua futura utilização. Numa alternativa, a sequência de polinucleótidos pode ser utilizada para a manipulação genética para "humanizar" o anticorpo ou para melhorar a afinidade, ou outras características do anticorpo. Por exemplo, a região constante pode ser modificada por meio de engenharia genética para se parecer mais a regiões constantes humanas para evitar a resposta imune se é utilizado o anticorpo em ensaios clínicos e tratamentos em seres humanos. Pode ser

desejável manipular geneticamente a sequência de anticorpo para obter maior afinidade ao NGF e maior eficácia para inibir o NGF. Será evidente para um perito na especialidade que pode ser realizada um ou mais mudanças de polinucleótidos para o anticorpo anti-NGF e manter ainda sua capacidade de ligação a NGF.

Existem quatro etapas gerais para humanizar um anticorpo monoclonal. Estas são: (1) determinar a sequência de nucleótidos e de aminoácidos predita dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve do anticorpo de partida (2) desenhar o anticorpo humanizado, isto é, decidir qual a região *framework* do anticorpo que será usada durante o processo de humanização (3) as técnicas/metodologias de humanização real e (4) a transfecção e expressão do anticorpo humanizado. Veja-se, por exemplo, as patentes dos Estados Unidos n.<sup>os</sup> 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; e 6.180.370.

Foram descritas várias moléculas de anticorpo "humanizado" que compreendem um sítio de ligação a antigénio derivadas de uma imunoglobulina não humana, incluindo anticorpos quiméricos que têm regiões V de roedores ou roedores modificadas e suas regiões determinantes da complementaridade (CDR) associadas fusionadas a domínios constantes. Veja-se, por exemplo, Winter et al. *Nature* 349:293-299 (1991), Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. *J Immunol.* 138:4534-4538 (1987) e Brown et al. *Cancer Res.* 47:3577-3583 (1987). Outras referências descrevem as CDR de roedores enxertadas numa região *framework* (FR) de suporte humana antes da fusão com um domínio constante de anticorpo humano apropriado. Veja-se, por exemplo, Riechmann et al. *Nature* 332:323-327 (1988), Verhocyan et al. *Science* 239:1534-1536 (1988) e Jones et al. *Nature* 321:522-525 (1986). Outra referência descreve CDRs de roedores que têm

como suporte regiões *framework* de roedores submetidas à técnica de *veneering* de forma recombinante. Veja-se, por exemplo, a publicação de patente europeia n.º 0519596. Estas moléculas "humanizadas" são desenhadas para minimizar a resposta imune não desejada com respeito a moléculas de anticorpo de roedor anti-humano que limita a duração e eficácia de aplicações terapêuticas de essas fracções em receptores humanos. Por exemplo, a região constante de anticorpo pode ser modificada por meio de engenharia genética de maneira que é imunologicamente inerte (por exemplo, não provoca a lise por complementos). Veja-se, por exemplo a publicação PCT n.º WO9958572, o pedido de patente de Reino Unido n.º 9809951.8. Outros métodos de humanização de anticorpos que também podem ser utilizados são revelados por Daugherty et al., Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 (1991) e nas patentes dos Estados Unidos n.ºs 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; e 6.350.861; e na publicação PCT n.º WO 01/27160.

Ainda em outra alternativa, podem ser obtidos anticorpos completamente humanos utilizando ratinhos disponíveis comercialmente que foram modificados por meio de engenharia genética para expressar proteínas de imunoglobulinas humanas específicas. Também podem ser utilizados animais transgênicos que são desenhados para produzir uma resposta imune mais desejável (por exemplo, anticorpos completamente humanos) ou mais robusto para a geração de anticorpos humanos ou humanizados. Exemplos de tal tecnologia são Xenomouse<sup>TM</sup> de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) e HuMAb-Mouse® e TC Mouse<sup>TM</sup> de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

Numa alternativa, podem ser preparados anticorpos de maneira recombinante e ser expressos utilizando qualquer método conhecido na técnica. Em outra alternativa, podem ser preparados anticorpos de maneira recombinante por meio da tecnologia de apresentação em fago (*phage display*).

Veja-se, por exemplo, patentes dos Estados Unidos n.<sup>os</sup> 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; e 6.265.150; e Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455 (1994). Alternativamente, a tecnologia de apresentação em fago (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) pode ser utilizada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpo *in vitro*, a partir de repertórios génicos de domínio variável (V) de imunoglobulinas de dadores imunizados. De acordo com esta técnica, os genes de domínio V de anticorpo são clonados em quadro para dar um gene de proteína de envoltório ou minoritária ou majoritária de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd, e são apresentados como fragmentos de anticorpo funcionais sobre a superfície da partícula de fago. Já que a partícula filamentososa contém uma cópia de ADN de cadeia simples do genoma do fago, as selecções baseando-se nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam na selecção do gene que codifica o anticorpo que mostra essas propriedades. Portanto, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A apresentação em fago pode ser realizada numa variedade de formatos; para revisão veja-se, por exemplo, Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993). Podem ser utilizada várias fontes de segmentos de gene V para a apresentação em fago. Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) isolaram um alinhamento diverso anticorpos anti-oxazolona a partir de uma biblioteca combinatória aleatória pequena de genes V derivados dos baços de ratinhos imunizados. Um repertório de genes V a partir de dadores humanos não imunizados pode ser construído e podem ser isolados anticorpos contra um alinhamento diverso de antigénios (incluindo auto-antigénios) essencialmente seguindo as técnicas descritas por Mark et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), ou Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Numa resposta imune natural, os genes de anticorpo acumulam mutações a

uma alta taxa (hipermutação somática). Algumas das mudanças introduzidas conferirão afinidade superior, e as células B que apresentam imunoglobulina de superfície de alta afinidade replicam-se preferentemente e diferenciam-se durante a exposição a antígeno posterior. Este processo natural pode ser imitado empregando a técnica conhecida como "transposição de cadeia". Marks, *et al.*, Bio/Technol. 10:779-783 (1992)). Neste método, a afinidade de anticorpos humanos "primários" obtida por meio de apresentação em fago pode ser melhorada substituindo sequencialmente os genes de região V de cadeia leve e pesada com repertórios de variantes (repertórios) que são produzidos de maneira natural de genes de domínio V obtidos a partir de doadores não imunizados. Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpo com afinidades no intervalo de pM-nM. Foi descrita uma estratégia para preparar repertórios de anticorpos de fago muito grandes (também conhecida como "a mãe de todas as bibliotecas") por Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res. 21:2265-2266 (1993). Também pode ser utilizada a transposição gênica para derivar anticorpos humanos a partir de anticorpos de roedores, em que o anticorpo humano tem afinidades e especificidades similares ao anticorpo de roedor de partida. De acordo com este método, que também é denominado "estampagem (*imprinting*) de epítipo", o gene de domínio V de cadeia leve ou pesada de anticorpos de roedor obtidos por meio da técnica de apresentação em fago é substituído por um repertório de genes de domínio V humano, criando quimeras de roedor-humano. A seleção em antígeno resulta no isolamento de regiões variáveis humanas que podem restabelecer um sítio de ligação a antígeno funcional, isto é, o epítipo dirige (estampa) a escolha do parceiro. Quando o processo se repete com o propósito de substituir o domínio V de roedor restante, é obtido um anticorpo humano (veja-se a publicação PCT n.º WO 93/06213, publicada em 1



de Abril de 1993). Ao contrário da imunização tradicional de anticorpos de roedor por meio do enxerto de CDR, esta técnica proporciona anticorpos completamente humanos, que não têm nenhum resíduo de CDR ou de região *framework* de origem roedor.

É evidente que embora a discussão anterior esteja relacionada com anticorpos humanizados, os princípios gerais tratados podem ser aplicados para criar a medida anticorpos para a utilização, por exemplo, em cães, gatos, primata, equinos e bovinos. É evidente além disso que podem ser combinados um ou mais aspectos da humanização de um anticorpo descrito no presente documento, por exemplo, enxerto de CDR, mutação na região *framework* e mutação na CDR.

Podem ser preparados anticorpos de maneira recombinante isolando em primeiro lugar os anticorpos e células que produzem anticorpos a partir de animais hospedeiros, obtendo a sequência génica, e utilizando a sequência génica para expressar o anticorpo de maneira recombinante em células hospedeiras (por exemplo, células CHO). Outro método que pode ser empregado é expressar a sequência anticorpo em plantas (por exemplo, tabaco) ou leite transgénico. Foram revelados métodos para expressar anticorpos de maneira recombinante em plantas ou leite. Veja-se, por exemplo, Peeters, et al. Vaccine 19:2756 (2001); Lonberg, N. e D. Huszar Int.Rev.Immunol 13:65 (1995); e Pollock, et al., J Immunol Methods 231:147(1999). Conhecem-se na técnica métodos para preparar derivados de anticorpos, por exemplo, humanizados, de cadeia simples, etc.

As técnicas de classificação por citometria de fluxo e imunoenaios tais como a classificação de células activadas por fluorescência (FACS) também podem ser empregadas para isolar anticorpos que são específicos para NGF.

Os anticorpos podem ser ligados a muitos portadores

diferentes. Os portadores podem ser activos e/ou inertes. Os exemplos de portadores bem conhecidos incluem polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilases, vidro, celulosas naturais e modificadas, poliacrilamidas, agaroses e magnetita. A natureza do portador pode ser ou bem solúvel ou bem insolúvel para os propósitos da invenção. Os peritos na especialidade conhecerão outros portadores adequados para unir anticorpos, ou poderão determinar tais, utilizando a experimentação rotineira.

O ADN que codifica os anticorpos monoclonais é isolado facilmente e sequencia-se utilizando procedimentos convencionais (por exemplo, utilizando sondas de oligonucleótido que podem ser ligadas especificamente a genes que codificam as cadeias leve e pesada dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem como fonte preferida de tal ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão (tais como vectores de expressão revelados na publicação PCT n.º WO 87/04462), que são transfectados então em células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que não produzem de outro modo proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Veja-se, por exemplo, a publicação PCT n.º WO 87/04462. O ADN também pode ser modificado, por exemplo, por meio da substituição da sequência codificante para domínios constantes de cadeia leve e pesada humanos em lugar das sequências de murino homólogas, Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851 (1984), ou por meio da ligação covalente à sequência codificante de imunoglobulina de toda ou parte da sequência codificante para um polipéptido não de imunoglobulina. Dessa maneira são preparados anticorpos "quiméricos" ou "híbridos" que têm a especificidade de ligação de um

anticorpo monoclonal anti-NGF no presente documento.

Podem ser caracterizados anticorpos anti-NGF utilizando métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um método é identificar o epítipo ao qual liga-se, ou "mapear epítipos". Existem muitos métodos conhecidos na técnica para mapear e caracterizar a localização de epítipos em proteínas, incluindo resolver a estrutura cristalina de um complexo anticorpo-antigénio, ensaios de competição, ensaios de expressão de fragmentos génicos e ensaios a base de péptidos sintéticos, tal como são descritos, 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. Num exemplo adicional, pode ser utilizado o mapeamento de epítipos para determinar a sequência à qual se liga a um anticorpo anti-NGF. O mapeamento de epítipos está disponível comercialmente a partir de diversas fontes, por exemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Os Países Baixos). O epítipo pode ser um epítipo linear, isto é, está contido num único trecho de aminoácidos, ou um epítipo conformacional formado por uma interacção tridimensional de aminoácidos que pode não estar contido necessariamente num único trecho. Podem ser isolados ou sintetizados (por exemplo, de maneira recombinante) péptidos de comprimentos variáveis (por exemplo, pelo menos de 4-6 aminoácidos de comprimento) e ser utilizados para ensaios de ligação com um anticorpo anti-NGF. Em outro exemplo, o epítipo ao qual liga-se o anticorpo anti-NGF pode ser determinado numa selecção sistemática utilizando péptidos sobrepostos derivados da sequência de NGF e determinando a ligação por meio do anticorpo anti-NGF. De acordo com os ensaios de expressão de fragmentos génicos, se fragmenta o quadro de leitura aberta que codifica NGF ou aleatoriamente ou por meio de construções genéticas específicas e é determinado a reactividade dos fragmentos

expressados de NGF com o anticorpo a ser testado. Os fragmentos génicos podem ser produzidos, por exemplo, por meio de PCR e então são transcritos e traduzidos para dar a proteína *in vitro*, em presença de aminoácidos radioactivos. Então é determinada a ligação do anticorpo aos fragmentos NGF marcados de maneira radioactiva por meio de imunoprecipitação e eletroforese em gel. Também podem ser identificados certos epítomos utilizando bibliotecas grandes de sequências de péptidos aleatórios apresentados na superfície de partículas de fago (bibliotecas de fago). Alternativamente, uma biblioteca definida de fragmentos de péptidos sobrepostos pode ser testada para determinar a ligação ao anticorpo de teste em ensaios de ligação simples. Num exemplo adicional, pode ser realizada a mutagénese de um domínio de ligação a antigénio, experiências de intercambio de domínios e mutagénese de varredura por meio de alanina para identificar resíduos requeridos, suficientes e/ou necessários para a ligação ao epítomo. Por exemplo, podem ser realizadas experiências de intercâmbio de domínios utilizando um NGF mutante em que foram substituídos (permutado) diversos fragmentos do polipéptido NGF por sequências de uma proteína relacionada de maneira próxima, mas antigénicamente distinta (tal como outro membro da família de proteínas de neurotrofina). Por meio da avaliação da ligação do anticorpo ao NGF mutante, pode ser avaliada a importância da ligação do fragmento de NGF particular ao anticorpo.

Ainda outro método que pode ser utilizado para caracterizar um anticorpo anti-NGF é utilizar ensaios de competição com outros anticorpos que se sabe que se ligam ao mesmo antigénio, isto é, diversos fragmentos em NGF, para determinar se o anticorpo anti-NGF liga-se ao mesmo epítomo que outros anticorpos. Os peritos na especialidade conhecem bem os ensaios de competição. Os exemplos de anticorpos que podem ser utilizados nos ensaios de

competição para a presente invenção incluem MAb 911, 912, 938, tal como é descrito em Hongo, et al., Hybridoma 19:215-227 (2000).

#### Outros antagonistas de NGF

São descritos no presente documento antagonistas de NGF distintos dos anticorpos anti-NGF para propósitos comparativos. Um antagonista de NGF pode ser pelo menos uma molécula anti-sense que pode bloquear ou diminuir a expressão de um NGF funcional. Conhecem-se sequências de nucleótidos do NGF e estão facilmente disponíveis a partir de bases de dados disponíveis públicas. Veja-se, por exemplo, Borsani et al., Nuc. Acids Res. 1990, 18, 4020; número de registo NM 002506; Ullrich et al., Nature 303:821-825 (1983). É rotineiro preparar moléculas de oligonucleótidos anti-sense que se ligarão especificamente ao ARNm de NGF sem reacções cruzadas com outros polinucleótidos. Os sítios de selecção como alvo exemplares incluem, mas não são limitados a, o codão de iniciação, as regiões reguladoras em 5', a sequência codificante e a região não traduzida em 3'. Os oligonucleótidos podem ser de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de comprimento, de aproximadamente 15 a 50 nucleótidos de comprimento, de aproximadamente 18 a 25 nucleótidos de comprimento, ou mais. Os oligonucleótidos podem compreender modificações de estrutura principal tais como, por exemplo, ligações de fosforotioato, e modificações de açúcar 2'-O bem conhecidas na técnica. As moléculas anti-sense exemplares incluem as moléculas anti-sense de NGF descritas na publicação dos Estados Unidos n.º 20010046959; veja-se também <http://www.rna-tec.com/repair.htm>.

Um antagonista de NGF pode ser pelo menos uma molécula anti-sense que pode bloquear ou diminuir a expressão de um receptor de NGF funcional (tal como TrkA e/ou p75). Woolf et al., J. Neuroscie (2001) 21(3):1047-55; Taglialetela et al., J Neurochem (1996) 66(5): 1826-35. Conhecem-se

sequências de nucleótidos de TrkA e p75 e estão facilmente disponíveis a partir de bases de dados disponíveis públicas.

Alternativamente, pode ser reduzida a expressão e/ou a libertação de NGF e/ou a expressão do receptor de NGF utilizando o silenciamento génico, oligonucleótidos de morfolino, ARNi ou ribozimas, método que são bem conhecidos na técnica. Veja-se <http://www.maclester.edu/~montgomery/RNAi.html>; <http://pub32.ezboard.com/finorpholinosfim19.showMessage?topicID=6.topic>; <http://www.highveld.com/ribozyme.html>.

Um antagonista de NGF pode ser pelo menos um composto inibidor de NGF. Tal como é utilizado no presente documento, "composto inibidor de NGF" refere-se a um composto distinto de um anticorpo anti-NGF que reduz, inibe, neutraliza ou elimina directa ou indirectamente a actividade biológica de NGF. Um composto inibidor de NGF deveria mostrar qualquer uma ou mais das seguintes características: (a) ser ligado a NGF; (b) inibir a actividade biológica de NGF ou vias a jusante mediadas por meio da função de sinalização de NGF; (c) prevenir, melhorar ou tratar qualquer aspecto da dor pós-cirúrgica; (d) bloquear ou reduzir a activação do receptor de NGF (incluindo autofosforilação e/ou dimerização do receptor TrkA); (e) aumentar a depuração de NGF; (f) inibir (reduzir) a síntese, produção ou libertação de NGF; (g) potenciar a recuperação a partir de cirurgia. Os compostos inibidores de NGF exemplares incluem os inibidores de NGF de molécula pequena descritos na publicação dos Estados Unidos n.º 20010046959; os compostos que inibem a ligação de NGF a p75, tal como é descrito na publicação PCT n.º WO 00/69829; os compostos que inibem a ligação de NGF a TrkA e/ou p75, tal como é descrito na publicação PCT n.º WO 98/17278. Os exemplos adicionais de compostos inibidores de NGF incluem os compostos descritos nas publicações PCT n.º<sup>os</sup>

WO 02/17914 e WO 02/20479, e nas patentes dos Estados Unidos n.ºs 5.342.942; 6.127.401; e 6.359.130. Os compostos inibidores de NGF exemplares adicionais são compostos que são inibidores competitivos de NGF. Veja-se a patente dos Estados Unidos n.º 6.291.247. Além disso, um perito na especialidade pode preparar outros compostos inibidores de NGF de moléculas pequenas.

Um composto inibidor de NGF pode ser ligado a NGF. Os sítios de selecção como alvo (ligação) exemplares incluem, mas não são limitados a, a parte do NGF que se liga ao receptor TrkA e/ou receptor p75, e aquelas partes do NGF que são adjacentes à região de ligação ao receptor e que são responsáveis, em parte, da conformação tridimensional correcta da parte de ligação ao receptor. Em outra forma de realização, um composto inibidor de NGF liga-se a um receptor de NGF (tal como TrkA e/ou p75) e inibe uma actividade biológica de NGF. Os sítios de selecção como alvo exemplares incluem aquelas partes de TrkA e/ou p75 que se ligam a NGF.

Uma molécula pequena pode ter um peso molecular de aproximadamente qualquer de 100 dalton a 20.000 dalton, de 500 dalton a 15.000 dalton ou de 1000 dalton a 10.000 dalton. Estão comercialmente disponíveis bibliotecas de moléculas pequenas. As moléculas pequenas podem ser administradas utilizando qualquer meio conhecido na técnica, incluindo inalação, por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via intramuscular, por via subcutânea, por via intratecal, por via intraventricular, por via oral, por via entérica, por via parentérica, por via intranasal, ou por via dérmica. Em geral, quando o antagonista de NGF de acordo com a invenção é uma molécula pequena, será administrado à taxa de 0,1 mg/kg a 300 mg/kg do peso do paciente dividido em de uma a três ou mais dose. Para um paciente adulto de peso normal, podem ser administradas doses que variam entre 1 mg e 5 g por dose.

Um antagonista de NGF pode ser pelo menos um análogo estrutural de NGF. Os "análogos estruturais de NGF" referem-se a compostos que têm uma estrutura tridimensional similar como parte da de NGF e que podem ser ligados a um receptor de NGF em condições fisiológicas *in vitro* ou *in vivo*, em que a ligação inibe pelo menos parcialmente uma actividade biológica de NGF. Numa forma de realização, um análogo estrutural de NGF pode ser ligado a um receptor TrkA e/ou um receptor p75. Os análogos estruturais de NGF exemplares incluem, mas não são limitados a, os péptidos bicíclicos descritos na publicação PCT n.º WO 97/15593; os péptidos bicíclicos descritos na patente dos Estados Unidos n.º 6.291.247; os compostos cíclicos descritos na patente dos Estados Unidos n.º 6.017.878; e péptidos derivados de NGF descritos na publicação PCT n.º WO 89/09225. Também podem ser desenhados e sintetizados análogos estruturais de NGF adequados através de modelagem molecular de ligação NGF-receptor, por exemplo, por meio do método descrito na publicação PCT n.º WO 98/06048. Os análogos estruturais de NGF podem ser monómeros ou dímeros/oligómeros em qualquer combinação desejada das estruturas iguais ou diferentes para obter efeitos biológicos e afinidades melhorados.

Um antagonista de NGF pode ser pelo menos um mutante negativo dominante do receptor TrkA e/ou receptor p75. Um perito na especialidade pode preparar mutantes negativos dominantes de, por exemplo, o receptor TrkA de maneira que o receptor se unirá ao NGF e, portanto, actuará como um "escoadouro" para capturar os NGF. Os mutantes negativos dominantes, no entanto, não terão a bioactividade normal do receptor TrkA após a ligação a NGF. Os mutantes negativos dominantes exemplares incluem, mas não são limitados a, os mutantes descritos nas seguintes referências: Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95,10884; Eide *et al.*, J. Neurosci. 1996, 16, 3123; Liu *et al.*, J. Neurosci 1997, 17, 8749; Klein *et al.*, Cell 1990, 61, 647; Valenzuela *et al.*,



Neuron 1993, 10, 963; Tsoulfas et al., Neuron 1993, 10, 975; e Lamballe et al., EMBO J. 1993, 12, 3083. Os mutantes negativos dominantes podem ser administrados em forma de proteína ou em forma de um vector de expressão de maneira que o mutante negativo dominante, por exemplo, receptor TrkA mutante, expressa-se *in vivo*. A proteína ou o vector de expressão pode ser administrado utilizando qualquer meio conhecido na técnica, tal como por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via intramuscular, por via subcutânea, por via intratecal, por via intraventricular, por via oral, por via entérica, por via parentérica, por via intranasal, por via dérmica ou por meio de inalação. Por exemplo, a administração de vectores de expressão inclui administração local ou sistémica, incluindo injeção, administração oral, administração por cateter ou por pistola genética, e administração tópica. Um perito na especialidade está familiarizado com a administração de vectores de expressão para obter a expressão de uma proteína exógena *in vivo*. Veja-se, por exemplo, as patentes dos Estados Unidos n.ºs 6.436.908; 6.413.942; e 6.376.471.

Também pode ser utilizada a administração seleccionada como alvo de composições terapêuticas que contêm um polinucleótido anti-sense, vector de expressão ou polinucleótidos subgenómicos. São descritos técnicas de administração de ADN mediadas por receptor em, por exemplo, Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA (1990) 87:3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338. São administradas composições terapêuticas que contêm um polinucleótido num intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para a administração local num protocolo de terapia génica. Também podem ser

utilizados intervalos de concentração de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg, e de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN ou mais durante o protocolo de terapia génica. Os polipéptidos e polinucleótidos terapêuticos podem ser administradas utilizando portadores de administração de genes. O portador de administração de genes pode ser de origem viral ou não viral (veja-se geralmente, Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1994) 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy* (1994) 5:845; Connelly, *Human Gene Therapy* (1995) 1:185; e Kaplitt, *Nature Genetics* (1994) 6:148). A expressão de tais sequências codificantes pode ser induzidas utilizando potenciadores e/ou promotores heterólogos ou de mamífero endógenos. A expressão da sequência codificante pode ser constitutiva ou regulada.

Conhecem-se bem na técnica vectores a base de vírus para a administração de um polinucleótido desejado e a expressão numa célula desejada. Os portadores a base de vírus exemplares incluem, mas não são limitados a, retrovírus recombinantes (veja-se, por exemplo, as publicações PCT n.ºs WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; as patentes dos Estados Unidos n.ºs 5.219.740 e 4.777.127; a patente GB n.º 2.200.651; e a patente EP n.º 0 345 242), vectores a base de alfavírus (por exemplo, vectores de vírus Sindbis, vectores de vírus da floresta de Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), vírus do rio Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) e vírus de encefalite equina venezuelana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), e vírus adenoassociado (VAA) (veja-se, por exemplo, as publicações PCT n.ºs WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 e WO 95/00655). Também pode ser empregado a administração de ADN unido a adenovírus inactivado tal como é descrito em Curiel, *Hum. Gene Ther.*

(1992) 3:147.

Também podem ser empregados métodos e portadores de administração não viral, incluindo, mas não limitados a, ADN condensado polycatiónico unido ou não unido a adenovírus inactivado sozinho (veja-se, por exemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); ADN unido a ligando (veja-se, por exemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); células de portadores de administração de célula eucariota (veja-se, por exemplo, a patente dos Estados Unidos n.º 5.814.482; as publicações PCT n.ºs WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; e WO 97/42338) e neutralização ou fusão de carga nucleica com membranas celulares. Também se pode utilizar ADN nu. São descritos métodos de introdução de ADN nu exemplares na publicação PCT n.º WO 90/11092 e na patente dos Estados Unidos n.º 5.580.859. São descritos lipossomas que podem actuar como portadores de administração de genes na patente dos Estados Unidos n.º 5.422.120; as publicações PCT n.ºs WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; e a patente EP n.º 0524968. São descritos enfoques adicionais em Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411, e em Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581.

Também é evidente que pode ser utilizada um vector de expressão para a expressão directa de qualquer dos antagonistas de NGF a base de proteínas descritos no presente documento (por exemplo, anticorpo anti-NGF, imunoadesina de TrkA, etc.). Por exemplo, conhecem-se na técnica outros fragmentos de receptor TrkA que podem bloquear (bloqueio desde parcial até completo) NGF e/ou uma actividade biológica de NGF.

Um antagonista de NGF pode ser pelo menos uma imunoadesina de TrkA. As imunoadesinas de TrkA tal como são utilizadas no presente documento referem-se a moléculas quiméricas solúveis que compreendem o domínio extracelular de um receptor TrkA e uma sequência de imunoglobulina, que

conserva a especificidade de ligação do receptor TrkA (substancialmente conserva a especificidade de ligação do receptor trkA) e pode ser ligado a NGF.

Conhecem-se na técnica imunoadesinas de TrkA e foi encontrado que bloqueiam a ligação de NGF ao receptor TrkA. Veja-se, por exemplo, a patente dos Estados Unidos n.º 6.153.189. Brennan *et al.* notificam a administração de imunoadesina de TrkA num modelo de rato de dor pós-cirúrgica. Veja-se Society for Neuroscience Abstracts 24 (1-2) 880 (1998). A imunoadesina de TrkA pode compreender uma fusão de uma sequência de aminoácidos do receptor TrkA (ou uma parte da mesma) a partir do domínio extracelular de TrkA que pode ser ligado a NGF (em algumas formas de realização, uma sequência de aminoácidos que conserva substancialmente a especificidade de ligação do receptor trkA) e uma sequência de imunoglobulina. O receptor TrkA pode ser uma sequência de receptor TrkA humano, e a fusão é com uma sequência de domínio constante de imunoglobulina. A sequência de domínio constante de imunoglobulina pode ser uma sequência de domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina. A associação de duas fusões de cadeia pesada de imunoglobulina-receptor TrkA (por exemplo, por meio de ligação covalente por meio de ponte(s) dissulfeto) pode resultar numa estrutura de tipo imunoglobulina homodimérica. Uma cadeia leve de imunoglobulina pode ser associada adicionalmente a uma ou ambas das quimeras de receptor TrkA-imunoglobulina no dímero com ponte dissulfeto para proporcionar uma estrutura homotrimérica ou homotetramérica. Os exemplos de imunoadesinas de TrkA adequadas incluem as descritas na patente dos Estados Unidos n.º 6.153.189.

Um antagonista de NGF pode ser pelo menos um anticorpo anti-TrkA que pode bloquear, suprimir, modificar e/ou reduzir a interação física de NGF com o receptor TrkA e/ou sinalização a jusante, por meio do qual se reduz e/ou

bloqueia uma actividade biológica de NGF. Conhecem-se na técnica anticorpos anti-TrkA. Os anticorpos anti-TrkA a modos de exemplo incluem os descritos nas publicações PCT n.<sup>os</sup> WO 97/21732, WO 00/73344, WO 02/15924, e a publicação dos Estados Unidos n.º 20010046959.

Um antagonista de NGF pode ser pelo menos um anticorpo anti-p75 que pode bloquear, suprimir e/ou reduzir a interacção física de NGF com o receptor p75 e/ou sinalização a jusante, por meio do qual se reduz e/ou bloqueia uma actividade biológica de NGF.

Um antagonista de NGF pode ser pelo menos um inibidor de quinase que pode inibir a sinalização de quinase a jusante associada à actividade de receptor TrkA e/ou p75. Um inibidor de quinase exemplares é K252a ou K252b, que é conhecido na técnica e é descrito em Knusel *et al.*, J. Neurochem. 59:715-722 (1992); Knusel *et al.*, J. Neurochemistry 57:955-962 (1991); Koizumi *et al.*, J. Neuroscience 8:715-721 (1988); Hirata *et al.*, Chemical Abstracts 111:728, XP00204135, veja-se abstract e 12th Collective Chemical Substance Index, pág. 34237, c. 3 (5-7), 55-60, 66-69), pág. 34238, c.1 (41-44), c.2 (25-27, 32-33), pág. 3423, c.3 (48-50, 52-53); e patente dos Estados Unidos n.º 6.306.849.

Espera-se que várias outras categorias de antagonistas de NGF sejam identificadas se o médico as busca.

#### Identificação de anticorpos anti-NGF e outros antagonistas de NGF

Podem ser identificados ou ser caracterizados anticorpos anti-NGF e outros antagonistas de NGF utilizando métodos conhecidos na técnica, por meio dos quais é detectado e/ou medido uma redução, melhora ou neutralização de uma actividade biológica de NGF. Por exemplo, pode ser utilizado um ensaio de activação de receptor de quinase (KIRA) descrito nas patentes dos Estados Unidos n.<sup>os</sup> 5.766.863 e 5.891.650, para identificar antagonistas de

NGF. Este ensaio tipo ELISA é adequado para a medição qualitativa ou quantitativa de activação de quinase medindo a autofosforilação do domínio quinase de uma proteína receptora tirosina quinase (a seguir no presente documento "rPTK"), por exemplo receptor TrkA, assim como também para a identificação e caracterização de possíveis antagonistas de uma rPTK seleccionada, por exemplo, TrkA. A primeira etapa do ensaio implica a fosforilação do domínio quinase de um receptor de quinase, por exemplo, um receptor TrkA, estando presente o receptor na membrana celular de uma célula eucariota. O receptor pode ser um receptor endógeno ou ácido nucleico que codifica o receptor, ou uma construção de receptor, pode ser transformado na célula. Normalmente, uma primeira fase sólida (por exemplo, um poço de uma primeira placa de ensaio) é recoberta com uma população substancialmente homogénea de tais células (normalmente uma linha de células de mamífero) de modo que as células se aderem à fase sólida. Com frequência, as células são aderentes e desse modo aderem-se de maneira natural à primeira fase sólida. Se é utilizado uma "construção de receptor", normalmente compreende uma fusão de um receptor de quinase e um polipéptido flag. O polipéptido flag é reconhecido pelo agente de captura, com frequência um anticorpo de captura, na parte ELISA do ensaio. Então é adicionado um analito, tal como um anticorpo anti-NGF candidato ou outros antagonistas de NGF, junto com NGF aos poços que têm as células aderentes, de maneira que o receptor de tirosina quinase (por exemplo receptor TrkA) é exposto a (ou contacta com) NGF e o analito. Este ensaio permite a identificação de anticorpos (ou outro antagonistas de NGF) que inibem a activação de TrkA por meio de seu ligando NGF. Após a exposição a NGF e o analito, as células de adesão são solubilizadas utilizando um tampão de lise (que tem um detergente de solubilização no mesmo) e agitação suave, liberando desse

modo o lisado celular que pode ser submetido à parte ELISA do ensaio directamente, sem a necessidade de concentração ou clarificação do lisado celular.

O lisado celular assim preparado está pronto então para ser submetido à etapa ELISA do ensaio. Como primeira etapa na etapa ELISA, uma segunda fase sólida (normalmente um poço de uma placa de microtitulação de ELISA) é recoberta com um agente de captura (com frequência um anticorpo de captura) que se liga especificamente ao receptor de tirosina quinase, ou, no caso de uma construção de receptor, ao polipéptido flag. O recobrimento da segunda fase sólida é levada a cabo de modo que o agente de captura se adere à segunda fase sólida. O agente de captura é geralmente um anticorpo monoclonal, mas, tal como é descrito nos exemplos no presente documento, também podem ser utilizados anticorpos policlonais. Então é exposto o lisado celular obtido a, ou contacta com, o agente de captura de adesão de modo que o receptor ou construção de receptor se adere a (ou se captura em) a segunda fase sólida. Então é levada a cabo uma etapa de lavagem, de modo que o lisado celular não ligado é eliminado, deixando a construção de receptor ou receptor capturado. A construção de receptor ou receptor capturado ou de adesão é exposto então a, ou contacta com, um anticorpo anti-fosfotirosina que identifica resíduos de tirosina fosforilada no receptor de tirosina quinase. Numa forma de realização, o anticorpo anti-fosfotirosina está conjugado (directa ou indirectamente) com uma enzima que catalisa uma mudança de cor de um reagente corante não radioactivo. Por conseguinte, a fosforilação do receptor pode ser medida por uma mudança de cor posterior do reagente. A enzima pode ser ligada ao anticorpo anti-fosfotirosina directamente, ou uma molécula de conjugação (por exemplo, biotina) pode ser conjugada com o anticorpo anti-fosfotirosina e a enzima pode ser ligada posteriormente ao anticorpo anti-

fosfotirosina por meio da molécula de conjugação. Finalmente, a ligação do anticorpo anti-fosfotirosina à construção de receptor ou receptor capturado é medida, por exemplo, por uma mudança de cor no reagente corante.

Os antagonistas de NGF também podem ser identificados incubando um agente candidato com NGF e monitorizando qualquer uma ou mais das seguintes características: (a) ligação a NGF; (b) inibição de actividade biológica de NGF ou vias a jusante mediadas por meio da função de sinalização de NGF; (c) inibição, bloqueio ou redução de activação de receptor de NGF (incluindo a autofosforilação e/ou dimerização de TrkA); (d) aumento da depuração de NGF; (e) tratamento ou prevenção de qualquer aspecto da dor pós-cirúrgica; (f) inibição (redução) da síntese, produção ou libertação de NGF; (g) potenciação da recuperação a partir de cirurgia. Em algumas formas de realização, um antagonista de NGF é identificado incubando um agente candidato com NGF e monitorizando a ligação e a redução ou neutralização associada de uma actividade biológica de NGF. O ensaio de ligação pode ser realizado com polipéptido(s) de NGF purificado(s), ou com células que expressam de maneira natural, ou transfectadas para expressar, polipéptido(s) de 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 antagonista de NGF conhecido pela ligação a NGF. O ensaio pode ser realizado em diversos formatos, incluindo o formato ELISA. Em outras formas de realização, um antagonista de NGF é identificado incubando um agente candidato com NGF e monitorizando a inibição associada da autofosforilação e/ou dimerização do receptor TrkA.

Após a identificação inicial, a actividade de um antagonista anti-NGF candidato pode ser confirmada adicionalmente e ser aperfeiçoada por meio de bioensaios, conhecidos para testar as actividades biológicas



seleccionadas como alvo. Alternativamente, podem ser utilizados bioensaios para seleccionar candidatos directamente. Por exemplo, NGF promove várias mudanças morfollogicamente reconhecíveis em células de resposta. Estes incluem, mas não são limitados a, promover a diferenciação de células PC 12 e potenciar o crescimento de neuritos a partir destas células (Urfer *et al.*, *Biochem.* 36:4775-4781 (1997); Tsoulfas *et al.*, *Neuron* 10:975-990 (1993)), promover o crescimento de neuritos a partir de explantes de gânglios simpáticos e sensoriais de resposta (Levi-Montalcini, R. e Angeletti, P. Nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 48, 534-569, 1968) e promover a sobrevivência de neurónios dependentes de NGF tais como neurónios de gânglio de raiz dorsal embrionário, gânglio trigeminal ou gânglio simpático (por exemplo, Chun & Patterson, *Dev. Biol.* 75:705-711, (1977); Buchman & Davies, *Development* 118:989-1001, (1993). Portanto, o ensaio para determinar a inibição da actividade biológica de NGF envolve cultivar células de resposta a NGF com NGF mais um analito, tal como um anticorpo anti-NGF candidato e um antagonista de NGF candidato. Após um tempo apropriado será submetida a ensaio a resposta celular (diferenciação celular, crescimento de neuritos ou sobrevivência celular).

A capacidade de um antagonista de NGF candidato para bloquear ou neutralizar uma actividade biológica de NGF também pode ser avaliada monitorizando a capacidade do agente candidato para inibir a sobrevivência mediada por NGF no bioensaio de sobrevivência de gânglios de raiz dorsal de rato embrionária tal como é descrito em Hongo *et al.*, *Hybridoma* 19:215-227 (2000).

#### Composições para a utilização nos métodos da invenção

As composições usadas nos métodos da invenção compreendem uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-NGF, e, em algumas formas de realização, compreendem além disso um excipiente farmacologicamente aceitável. Em algumas

formas de realização, a composição é para a utilização em qualquer dos métodos descritos no presente documento. Também são descritos exemplos de tais composições, assim como também como são formuladas, numa secção anterior e a seguir. Numa forma de realização, a composição compreende um anticorpo anti-NGF. Em outra forma de realização, a composição compreende um ou mais antagonistas de NGF. Em outra forma de realização, a composição compreende um ou mais antagonistas de NGF seleccionados de um qualquer ou mais dos seguintes: um antagonista (por exemplo, um anticorpo) que se liga a (interage fisicamente com) NGF, um antagonista que se liga a um receptor de NGF (tal como um receptor TrkA e/ou p75), e um antagonista que reduz (impede e/ou bloqueia) a sinalização do receptor de NGF a jusante. Ainda em outras formas de realização, a composição compreende qualquer antagonista de NGF que não seja uma imunoadesina de TrkA (isto é, diferente de uma imunoadesina de TrkA). Em outras formas de realização, a composição compreende qualquer antagonista de NGF que seja diferente de um anticorpo anti-NGF. Ainda em outras formas de realização, a composição compreende qualquer antagonista de NGF que seja diferente de uma imunoadesina de TrkA e diferente de um anticorpo anti-NGF. Em outras formas de realização, um antagonista de NGF inibe (reduz) a síntese, produção ou libertação de NGF. Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF liga-se a NGF e não reage de maneira cruzada significativamente com neurotrofinas relacionadas (tais como NT3, NT4/5 e/ou BDNF). Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF não está associado a uma resposta imune adversa. Em algumas formas de realização, o antagonista de NGF é seleccionado do grupo que consiste em um anticorpo anti-NGF, uma molécula anti-sense dirigida frente a um NGF (incluindo uma molécula anti-sense dirigida frente a um ácido nucleico que codifica NGF), uma molécula anti-sense dirigida frente a um receptor

de NGF (tal como TrkA e/ou p75), um composto inibidor de NGF, um análogo estrutural de NGF, uma mutação negativa dominante de um receptor TrkA que se liga a um NGF, uma imunoadesina de TrkA, um anticorpo anti-TrkA, um anticorpo anti-p75 e um inibidor de quinase. Em outra forma de realização, o antagonista de NGF é um anticorpo anti-NGF. Em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF reconhece NGF humano. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é humano. Ainda em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF está humanizado (tal como anticorpo E3 descrito no presente documento). Ainda em outra forma de realização, o anticorpo anti-NGF compreende uma região constante que não provoca uma resposta imune não desejada ou não esperada, tal como a lise mediada por anticorpo ou ADCC. Em outras formas de realização, o anticorpo anti-NGF compreende uma ou mais CDR(s) de anticorpo E3 (tal como uma, dois, três, quatro, cinco, ou, em algumas formas de realização, todas as seis CDR de E3).

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

A composição usada na presente invenção pode compreender além disso portadores, excipientes ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup> Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover.), em

forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os portadores, excipientes ou estabilizadores aceitáveis não são tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações, e podem compreender tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquilparabenos tal como metil ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (menos de aproximadamente 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono incluindo glicose, manose ou dextranos; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; contra-íões formadores de sal tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo complexos de Zn-proteína); e/ou tensioactivos não iónicos tais como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> ou polietilenoglicol (PEG). São descritos adicionalmente no presente documento excipientes farmacêuticamente aceitáveis. O antagonista de NGF e composições do mesmo também podem ser utilizada conjuntamente com outros agentes que servem para potenciar e/ou complementar a eficácia dos agentes.

#### Kits

Os kits da invenção incluem um ou mais recipientes que compreendem um anticorpo anti-NGF (tal como anticorpo humanizado E3 descrito no presente documento), e em algumas formas de realização, compreendem além disso instruções para a utilização de acordo com qualquer dos métodos da invenção descritos no presente documento. Em alguma forma

de realização, o kit compreende um anticorpo anti-NGF (tal como anticorpo E3 descrito no presente documento). Em outras formas de realização, o kit compreende um anticorpo anti-NGF que compreende um ou mais CDR(s) de anticorpo E3 (tal como uma, dois, três, quatro, cinco, ou, em algumas formas de realização, todas as seis CDR de E3). Em algumas formas de realização, estas instruções compreendem uma descrição da administração do antagonista de NGF para tratar, melhorar ou prevenir a dor pós-cirúrgica de acordo com qualquer dos métodos descritos no presente documento. O kit pode compreender além disso uma descrição da selecção de um indivíduo adequado para o tratamento baseando-se em identificar se esse indivíduo tem dor pós-cirúrgica ou se o indivíduo está em risco de dor pós-cirúrgica. Ainda em outras formas de realização, a instrução compreende uma descrição da administração de um antagonista de NGF para tratar, prevenir e/ou melhorar a dor pós-cirúrgica. Ainda em outras formas de realização, as instruções compreendem uma descrição da administração de um antagonista de NGF a um indivíduo em risco de dor pós-cirúrgica.

As instruções em relação com a utilização de um anticorpo anti-NGF geralmente incluem informação em quanto a dosagem, programa de dosagem e via de administração para o tratamento pretendido. Os recipientes podem ser doses unitárias, embalagens a granel (embalagens de múltiplas doses) ou dose sub-unitárias. As instruções fornecidas nos kits da invenção são instruções normalmente escritas numa etiqueta ou prospecto (por exemplo, uma folha de papel incluída no kit), mas também são aceitáveis instruções legíveis por máquina (por exemplo, instruções suportadas num disco de armazenamento óptico ou magnético).

A etiqueta ou o prospecto indica que a composição é utilizada para tratar, melhorar e/ou prevenir a dor pós-cirúrgica. Podem ser proporcionadas instruções para pôr em prática qualquer dos métodos descritos no presente

documento.

Os kits desta invenção estão em embalagens adequadas. As embalagens adequadas incluem, mas não são limitadas a, viais, frascos, garrafas, embalagens flexíveis (por exemplo, bolsas de plástico ou Mylar seladas), e similares. Também contemplam-se embalagens para a utilização em combinação com um dispositivo específico, tais como um inalador, dispositivo de administração nasal (por exemplo, um atomizador) ou um dispositivo de infusão tal como uma minibomba. Um kit pode ter um orifício de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um vial que tem uma tampa que pode ser furada por meio de uma agulha de injeção hipodérmica). O recipiente também pode ter um orifício de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um vial que tem uma tampa que ser furada por meio de uma agulha de injeção hipodérmica). Pelo menos um agente activo na composição é um antagonista de NGF, tal como um anticorpo anti-NGF. O recipiente pode compreender além disso um segundo agente farmacologicamente activo.

Os kits podem proporcionar opcionalmente componentes adicionais tais como tampões e informação interpretativa. Normalmente, o kit compreende um recipiente e uma etiqueta ou prospecto(s) em ou associados ao recipiente.

#### Administração de um anticorpo anti-NGF e avaliação do tratamento

O anticorpo anti-NGF pode ser administrado a um indivíduo por meio de qualquer via adequada. Por exemplo, o anticorpo anti-NGF pode ser administrado por via oral, por via intravenosa, por via sublingual, por via subcutânea, por via intra-arterial, por via intra-sinovial, intravescicular (tal como por meio da bexiga), por via intramuscular, por via intracardíaca, por via intratorácica, por via intraperitoneal, por via intraventricular, por via sublingual, por meio de inalação,

por meio de supositório e por via transdérmica. Podem ser administrada por via oral, por exemplo, em forma de comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, obreias, chupa-chupa, goma para mascar ou similares preparados por meio de métodos reconhecidos na técnica. Deveria ser evidente para um perito na especialidade que os exemplos descritos no presente documento não pretendem ser limitativos mas que são ilustrativos das técnicas disponíveis.

Por conseguinte, em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF é administrado a um indivíduo de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa, por exemplo, como bólus ou por meio de infusão contínua ao longo de um período de tempo, por meio de vias intramuscular, intraperitoneal, intra-cérebro-espinhal, subcutânea, intra-articular, intra-sinovial, intratecal, oral, de inalação ou tópica. São úteis para a administração nebulizadores comercialmente disponíveis para formulações líquidas, incluindo nebulizadores de jacto e nebulizadores ultrassónicos. Podem ser nebulizadas directamente formulações líquidas e pode ser nebulizado pó liofilizado após a reconstituição. Alternativamente, o anticorpo anti-NGF pode ser administrado via aerossol utilizando uma formulação de fluorocarbono e um inalador de dose medida ou ser inalada como pó moído e liofilizado.

Numa forma de realização, um anticorpo anti-NGF é administrado por meio de técnicas de administração local direccionada ou específica do sítio. Os exemplos de técnicas de administração local direccionada ou específica do sítio incluem diversas fontes de depósito implantáveis do antagonista de NGF ou cateteres de administração local, tal como cateteres de infusão, um cateter de drenagem ou um cateter de agulha, enxertos sintéticos, envoltórios adventíciais, derivações e endopróteses ou outros dispositivos implantáveis, portadores específicos do sítio,

injecção directa ou aplicação directa. Veja-se, por exemplo, a publicação PCT n.º WO 00/53211 e a patente dos Estados Unidos n.º 5.981.568.

Podem ser utilizadas diversas formulações de um anticorpo anti-NGF para a administração. Em algumas formas de realização, um anticorpo anti-NGF pode ser administrado puro. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-NGF pode estar em diversas formulações, incluindo formulações que compreendem um excipiente farmacologicamente aceitável. Conhecem-se na técnica excipientes farmacologicamente aceitáveis, e são substâncias relativamente inertes que facilitam a administração de uma substância farmacologicamente eficaz. Por exemplo, um excipiente pode proporcionar forma ou consistência ou agir como diluente. Os excipientes adequados incluem, mas não são limitados a, agentes estabilizantes, agentes humectantes e emulsionantes, sais para variar a osmolaridade, agentes de encapsulamento, tampões e potenciadores da penetração na pele. São expostos excipientes assim como também formulações para a administração de fármacos parentérica e não parentérica em Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. Mack Publishing (2000).

Em algumas formas de realização, estes agentes são formulados para a administração por meio de injecção (por exemplo, por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via subcutânea, por via intramuscular, etc.). Por conseguinte, estes agentes podem ser combinados com portadores farmacologicamente aceitáveis tais como solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose e similares. O regime de dosagem particular, isto é, a dose, duração e repetição, dependerá do indivíduo particular e o histórico médico do indivíduo.

Um anticorpo anti-NGF pode ser administrado utilizando qualquer método adequado, incluindo por meio de injecção (por exemplo, por via intraperitoneal, por via intravenosa,



por via subcutânea, por via intramuscular, etc.). Também podem ser administrados anticorpos anti-NGF por meio de inalação, tal como é descrito no presente documento. Geralmente, para a administração de anticorpos anti-NGF, uma dosagem candidata inicial pode ser de aproximadamente 2 mg/kg. Para o propósito da presente invenção, uma dosagem diária típica poderia variar entre aproximadamente qualquer de 3 µg/kg e 30 µg/kg e 300 µg/kg e 3 mg/kg, e 30 mg/kg e 100 mg/kg ou mais, Dependendo dos factores mencionados anteriormente. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo do estado, o tratamento é sustentado até que se produza uma supressão desejada dos sintomas ou até que sejam conseguidos níveis terapêuticos suficientes para reduzir a dor pós-cirúrgica. Um regime de dosagem exemplar compreende administrar uma dose inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguida de uma dose de manutenção semanal de aproximadamente 1 mg/kg do anticorpo anti-NGF, ou seguida de uma dose de manutenção de aproximadamente 1 mg/kg a cada outra semana. No entanto, podem ser úteis outros regimes de dosagem, dependendo do padrão de diminuição farmacocinética que o médico deseja alcançar. Por exemplo, contempla-se a dosagem de uma-quatro vezes por semana. A evolução desta terapia é monitorizada facilmente por meio de técnicas e ensaios convencionais. O regime de dosagem (incluindo o(s) antagonista(s) de NGF utilizados(s)) pode variar ao longo do tempo.

Em geral, quando não é um anticorpo, um antagonista de NGF pode ser administrado (em algumas formas de realização comparativas) à taxa de aproximadamente 0,1 mg/kg a 300 mg/kg do peso do paciente dividido em de uma a três doses, ou tal como é revelado no presente documento. Em algumas formas de realização, para um paciente adulto de peso normal, podem ser administradas doses que variam entre aproximadamente 0,3 mg/kg e 5,00 mg/kg. O regime de dosagem particular, isto é, a dose, duração e repetição, dependerá

do indivíduo particular e o histórico médico do indivíduo, assim como também as propriedades dos agentes individuais (tais como a semivida do agente e outras considerações bem conhecidas na técnica).

Para o propósito da presente invenção, a dosagem apropriada de um anticorpo anti-NGF dependerá do(s) anticorpo(s) anti-NGF (ou composições dos mesmos) empregados, o tipo e a gravidade da dor a ser tratada, se o agente é administrado para propósitos terapêuticos ou preventivos, terapia prévia, o histórico clínico do paciente e a resposta ao agente, e o critério do médico responsável. Normalmente o médico administrará um anticorpo anti-NGF, até que seja alcançada uma dosagem que consiga o resultado desejado.

As considerações empíricas, tais como semivida, geralmente contribuirão à determinação da dosagem. Por exemplo, podem ser utilizados anticorpos que são compatíveis com o sistema imune humano, tais como anticorpos humanizados ou anticorpos completamente humanos, para prolongar a semivida do anticorpo e para evitar que o anticorpo seja atacado pelo sistema imune hospedeiro. A frequência de administração pode ser determinada e ajustada ao longo do curso da terapia, e geralmente baseia-se, mas não necessariamente, no tratamento e/ou supressão e/ou melhora e/ou atraso da dor. Alternativamente, podem ser apropriadas formulações de libertação contínua sustentada de anticorpos anti-NGF. Conhecem-se na técnica diversas formulações e dispositivos para conseguir a libertação sustentada.

Numa forma de realização, podem ser determinadas dosagens para um anticorpo anti-NGF empiricamente em indivíduos aos que foi proporcionada uma ou mais administrações de um anticorpo. São proporcionados a indivíduos dosagens em incremento de um anticorpo anti-NGF. Para avaliar a eficácia de um anticorpo anti-NGF, pode ser

seguido um indicador da dor.

A administração de um anticorpo anti-NGF de acordo com o método na presente invenção pode ser contínua ou intermitente, dependendo, por exemplo, do estado fisiológico do receptor, se o propósito da administração é terapêutico ou profilático e outros factores conhecidos pelos médicos peritos. A administração de um anticorpo anti-NGF pode ser essencialmente contínua ao longo de um período de tempo pré-seleccionado ou pode ser numa série de doses espaçadas, por exemplo, ou antes, durante, ou depois do desenvolvimento da dor; antes; durante; antes e depois; durante e depois; antes e durante; ou antes, durante, e depois do desenvolvimento da dor. A administração pode ser antes, durante e/ou depois da ferida, incisão, traumatismo, cirurgia e qualquer outro evento que provavelmente provoca a dor pós-cirúrgica.

Em algumas formas de realização, podem estar presentes mais de um antagonista de NGF, tal como um anticorpo. O antagonista pode ser o mesmo ou diferente um do outro. Podem estar presentes pelo menos um, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco antagonistas de NGF diferentes. Geralmente, os antagonistas de NGF têm actividades complementares que não afectam de maneira adversa entre si. Também podem ser utilizados antagonistas de NGF conjuntamente com outros agentes que servem para potenciar e/ou complementar a eficácia dos agentes.

São preparadas formulações terapêuticas do anticorpo anti-NGF utilizado de acordo com a presente invenção para armazenamento misturando um anticorpo que tem o grau desejado de pureza com portadores, excipientes ou estabilizadores farmacologicamente aceitáveis, opcionais (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup> Ed. Mack Publishing (2000)), em forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os portadores,

excipientes ou estabilizadores aceitáveis não são tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregadas, e podem compreender tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; sais tais como cloreto de sódio; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio, cloreto de bencetónio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquilparabenos tais como metil ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (menos de aproximadamente 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; contra-íões formadores de sal tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo complexos de Zn-proteína); e/ou tensioactivos não iónicos tais como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> ou polietilenoglicol (PEG).

São preparados lipossomas que contêm o anticorpo anti-NGF por meio de métodos conhecidos na técnica, tal como é descrito em Epstein, et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 77:4030 (1980); e as patentes dos Estados Unidos n.<sup>os</sup> 4.485.045 e 4.544.545. São revelados lipossomas com aumento do tempo de circulação na patente dos Estados Unidos n.º 5.013.556. Podem ser gerados lipossomas particularmente úteis por meio do método de evaporação em fase inversa com uma composição lipídica que compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada de PEG (PEG-PE). Os lipossomas são submetidos a extrusão através

de filtros de tamanho de poro definido para proporcionar lipossomas com o diâmetro desejado.

Os princípios activos também podem estar incluídos em microcápsulas preparadas, por exemplo, por meio de técnicas de coacervação ou por meio de polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de gelatina ou hidroximetilcelulose e microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, em sistemas de administração de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são reveladas em Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup> Ed. Mack Publishing (2000).

Podem ser preparadas preparações de libertação sustentada. Os exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrófobos sólidos que contêm o anticorpo, matrizes que estão em forma de artigos conformados, por exemplo, películas, ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), ou poli(álcool vinílico)), poliláctidos (patentes dos Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de 7-etilo, acetato de etilenvinilo não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradável tais como LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (microesferas injectáveis compostas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), isobutirato acetato de sacarose e poli-(ácido D-(-)-3hidroxibutírico).

As formulações para serem utilizadas na administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é realizado facilmente por meio de, por exemplo, filtração através de membranas de filtração estéreis. Geralmente são colocadas composições terapêuticas de anticorpo anti-NGF num recipiente que tem

um orifício de acesso estéril, por exemplo, um vial ou uma bolsa de solução intravenosa que tem uma tampa que pode ser furada por meio de uma agulha de injeção hipodérmica.

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

Para preparar composições sólidas tais como comprimidos, mistura-se o princípio activo principal com um portador farmacêutico, por exemplo componentes de formação de comprimidos convencionais tais como amido de milho, lactose, sacarose, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio, fosfato de dicálcio ou gomas, e outros diluentes farmacêuticos, por exemplo água, para formar uma composição de pré-formulação sólida que contém uma mistura homogénea de um composto da presente invenção, ou um sal farmacêuticamente aceitável não tóxico do mesmo. Quando são denominadas homogéneas estas composições de pré-formulação, significa que o princípio activo está disperso de maneira uniforme por toda a composição de modo que a composição pode ser subdividida facilmente em formas farmacêuticas unitárias igualmente eficazes tais como comprimidos, pílulas e cápsulas. Esta composição de pré-formulação sólida se subdivide então em formas farmacêuticas unitárias do tipo descrito anteriormente que contém desde 0,1 mg até aproximadamente 500 mg do princípio activo da presente invenção. Os comprimidos ou as pílulas da nova composição podem estar recobertos ou compostos de outro modo para proporcionar uma forma farmacêutica que proporciona a vantagem de acção prolongada. Por exemplo, o comprimido ou a pílula pode compreender um componente de dosagem interna e um componente de dosagem externa, estando o último em forma de um envoltório sobre o primeiro. Os

dois componentes podem estar separados por uma camada entérica que serve para resistir a desintegração no estômago e permite que o componente interno passe intacto em direcção ao duodeno ou que sua libertação seja atrasada. Pode ser utilizada uma variedade de materiais para tais camadas entéricas ou recobrimentos, tais materiais incluem vários ácidos poliméricos e misturas de ácidos poliméricos com materiais tais como goma laca, álcool cetílico e acetato de celulose.

Os agentes tensioactivos adequados incluem, em particular, agentes não iónicos, tais como polioxietilensorbitanos (por exemplo Tween<sup>TM</sup> 20, 40, 60, 80 ó 85) e outros sorbitanos (por exemplo Span<sup>TM</sup> 20, 40, 60, 80 ó 85). As composições com um agente tensioactivo compreenderão de maneira conveniente entre 0,05% e 5% de agente tensioactivo, e pode estar entre 0,1% e 2,5%. Se apreciará que podem ser adicionados outros componentes, por exemplo, manitol ou outros portadores farmacêuticamente aceitáveis, se é necessário.

Podem ser preparados emulsões adequadas utilizando emulsões de gordura disponíveis comercialmente, tais como Intralipid<sup>TM</sup>, Liposyn<sup>TM</sup>, Infonutrol<sup>TM</sup>, Lipofundin<sup>TM</sup> e Lipiphysan<sup>TM</sup>. O princípio activo ou pode ser dissolvido numa composição de emulsão pré-misturada ou alternativamente pode ser dissolvido num óleo (por exemplo óleo de soja, óleo de cártamo, óleo de semente de algodão, óleo de gergelim, óleo de milho ou óleo de amêndoas) e uma emulsão formada após misturar com um fosfolípido (por exemplo fosfolípidos de ovo, fosfolípidos de soja ou lecitina de soja) e água. Será apreciado que podem ser adicionados outros componentes, por exemplo glicerol ou glicose, para ajustar a tonicidade da emulsão. As emulsões adequadas conterão normalmente até 20% de óleo, por exemplo, entre 5% e 20%. A emulsão de gordura pode compreender gotas de gordura entre 0,1  $\mu\text{m}$  e 1,0  $\mu\text{m}$ ,

particularmente 0,1  $\mu\text{m}$  e 0,5  $\mu\text{m}$ , e têm um pH no intervalo de 5,5 a 8,0.

As composições de emulsão podem ser as preparadas misturando um antagonista de factor de crescimento nervoso com Intralipid<sup>TM</sup> ou os componentes do mesmo (óleo de soja, fosfolípidos de ovo, glicerol e água).

As composições para inalação ou insuflação incluem soluções e suspensões em solventes orgânicos ou aquosos farmacologicamente aceitáveis, ou misturas dos mesmos, e pós. As composições líquidas ou sólidas podem conter excipientes farmacologicamente aceitáveis adequados tal como foram indicados anteriormente. Em algumas formas de realização, as composições são administradas por via respiratória nasal ou oral para o efeito local ou sistémico. Podem ser nebulizadas por meio da utilização de gases composições em solventes farmacologicamente aceitáveis preferentemente estéreis. As soluções nebulizadas podem ser aspiradas directamente desde o dispositivo de nebulização ou o dispositivo de nebulização pode estar unido a uma máscara facial, uma câmara ou máquina de respiração com pressão positiva intermitente. Podem ser administradas composições em solução, suspensão ou pó, preferentemente por via oral ou por via nasal, desde dispositivos que administram a formulação de uma maneira apropriada.

Pode ser avaliada a eficácia de tratamento por meio de métodos bem conhecidos na técnica.

#### EXEMPLOS

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

##### Exemplo 1

#### **O anticorpo monoclonal anti-NGF é eficaz no tratamento da dor pós-cirúrgica**

Foi utilizado um modelo de dor que imita a dor pós-cirúrgica para avaliar a eficácia do tratamento com anticorpo anti-NGF 911 (um anticorpo monoclonal de rato);



veja-se Hongo, et al., Hybridoma 19:215-227 (2000). Cada experiência envolveu 16 animais (n=8 por grupo). Foi injectado o anticorpo anti-NGF por via intraperitoneal (i.p.) a diversas concentrações por experiência (35 miligramas ou 7 miligramas por quilograma) 15 horas antes da incisão. O grupo controlo não recebeu anticorpo mas foi injectada i.p. uma solução salina.

Animais. Foram adquiridos ratos machos Sprague Dawley que pesavam entre 220-240 gramas de Harlan (São Diego) e foram aclimatados à instalação de animais durante uma semana antes da cirurgia.

Cirurgia. A cirurgia baseou-se no procedimento descrito por Brennan, et al. Pain 64:493-501 (1996). Foram anestesiados os animais com um 2% de isoflurano em mistura de ar que se manteve durante a cirurgia por meio de um cone de nariz. A superfície plantar da pata traseira direita foi preparada com um tampão de iodeto de povidona e foi realizada uma incisão longitudinal central de 1 cm através da pele e fáscia, começando 0,5 cm desde a beira do calcanhar e estendendo-se em direcção aos dedos. São realizadas medições com uma régua mantendo o pé numa posição flexionada. O músculo plantar foi elevado utilizando fórceps curvados e foi realizada a incisão longitudinalmente. Foi realizada a incisão no músculo através de sua profundidade completa, entre a origem e a inserção. A hemorragia foi controlada durante toda a cirurgia por meio de pressão aplicada por meio de um tampão de gaze. A ferida foi fechada com duas suturas em colchão (monofilamento negro ethilon 5-0). Nestas suturas foram feitos nós 5-6 vezes, atando o primeiro nó levemente. O sítio da ferida foi limpo com solução de bacitracina. Permitiu-se que os animais que se recuperassem e repousassem em jaulas limpas durante duas horas ou mais antes de começar os testes de comportamento.

Avaliação da dor em repouso. Foi utilizada uma

pontuação de dor acumulativa para avaliar a dor relacionada com o suporte de peso. Os animais foram colocados numa malha de plástico (grade: 8 mm<sup>2</sup>) em jaulas de plástico transparente que estavam elevadas numa plataforma (a: 18") permitindo a inspecção da parte inferior de suas patas. Após um período de aclimação de 20 minutos, foi avaliado o suporte de peso numa escala de 0 a 2. Uma pontuação foi dada de 0 se a pata ficava pálida ou estava pressionada contra a malha, o que indicava um suporte de peso completo. Uma pontuação foi dada de 1 se a pata estava em conformidade com a pele justo tocando a malha, sem ficar pálida ou sem formação de estrias da pele. Uma pontuação foi dada de 2 se a pata se mantinha completamente fora da malha. O encolhimento da pata foi considerado um 2 se o rato estava ainda em repouso. Foi observado cada animal durante 1 minuto a cada 5 minutos durante 30 minutos. Foi utilizado a soma de 6 pontuações (0-12) obtidas durante 1/2 horas para avaliar a dor no pé com incisão. Também foi calculada a frequência de pontuações de 2 e foi utilizada para avaliar a incidência de dor grave ou postura antiálgica da pata pelo animal. Foi testado cada animal 24 horas antes da cirurgia (avaliação inicial), e 2 h, 24 h, 48 h e 72 h após a intervenção cirúrgica. Os resultados desta experiência são mostrados na figura 1, que representa a pontuação de dor em repouso acumulativa observada em animais tratados com 35 mg/kg de anticorpo de ratinho 911 anti-NGF. Estes resultados demonstraram que o tratamento com anticorpo anti-NGF reduziu significativamente a dor em repouso pós-cirúrgica. O suporte de peso era uma boa correlação da disposição do animal de utilizar a extremidade, e portanto, era uma medida eficaz do alívio de dor.

Avaliação da dor provocada mecanicamente utilizando alodinia táctil. Foi medida a alodinia táctil com filamentos de Semmes-Weinstein von Frey (Stoelting, Wood

Dale, IL). Os animais foram colocados em jaulas de base de malha de plástico de 12 mm, elevadas numa plataforma (a: 18") permitindo o acesso à parte inferior de suas patas. Os animais se habituaram a este ambiente (ao longo de 1-2 dias da semana anterior) antes do início do experiência. Após um período de aclimação de 15 minutos, a alodinia táctil foi testada tocando a pele, na parte média e proximal ao ponto de entrada da incisão, no calcanhar da pata traseira do animal com filamentos de von Frey em ordem ascendente de força até que foi provocada uma resposta e retirada da pata. Foram utilizados números de von Frey de 4,08 a 5,46; cada número se correlaciona com uma força em gramas, tal como é descrito a seguir. Cada filamento de von Frey foi aplicado na superfície num ângulo recto, dobrando o filamento durante 2 s, ou até que foi produzida uma resposta. Uma vez que foi estabelecida a resposta de retirada, foi testada de novo a pata para mais dois ensaios, começando com o seguinte filamento de von Frey descendente até que não foi produzida resposta.

Foi registada a quantidade menor de força requerida para provocar uma resposta ao longo dos três ensaios como o limiar de retirada em gramas. A força maior de 29 g levantou a pata assim como que provocou uma resposta, representando desse modo o ponto de corte. Se não foi detectada resposta, foi registado o seguinte filamento ascendente "5,88". Foram testadas ambas patas esquerda e direita desta maneira. Foi testado cada animal 24 horas antes da cirurgia (avaliação inicial), e 2 h, 24 h, 48 h e 72 h após a intervenção cirúrgica. Foi testada a alodinia táctil após a pontuação de dor em repouso. Os resultados desta experiência são mostrados na figura 3, que proporciona a pontuação acumulativa em resposta à estimulação mecânica em animais tratados com 7 mg/kg de anticorpo anti-NGF 911. Estes resultados demonstraram que o tratamento com anticorpo anti-NGF reduziu a dor provocada

mecanicamente pós-cirúrgica.

Avaliação de hiperalgesia térmica. Foi avaliada a hiperalgesia térmica por meio da teste plantar de rato (Ugo Basile, Itália) seguindo um método modificado de Hargreaves, et al. (1988). Habituar-se os ratos ao aparelho que consistia em quatro caixas de metacrilato individuais numa mesa de cristal elevada. Foi colocada uma fonte de calor radiante móvel debaixo da mesa e foi focalizada sobre a pata traseira. Enquanto o animal está quieto, mas não dormido, o botão da caixa de controlo é apertado, a fonte de calor radiante é acesa e é registado automaticamente o tempo que tarda o animal em ser retirada da fonte de calor. Esta latência de retirada da pata (PWL) é detectada por meio de um detector de luz incrustado na fonte de calor radiante que percebe o movimento da pata do rato por meio de uma mudança da reflectância da fonte radiante. Foram registadas as latências de retirada da pata em segundos. Havia um ponto de corte automático de 22,5 s para evitar o dano de tecido. Fora tomadas PWL de três a quatro vezes para ambas patas traseiras de cada animal, a média das quais representavam linhas base para as patas traseiras direita e esquerda. Os resultados são apresentados como a proporção da pontuação medida na pata direita (sítio de cirurgia) e a pata esquerda. O aparelho foi calibrado uma vez (ao começo do estudo) e foi ajustado a uma intensidade de 40 para dar uma PWL normal de aproximadamente 6 segundos. Foi testado cada animal 24 horas antes da cirurgia (avaliação inicial), e 3 h, 24 h, 48 h e 72 h após a intervenção cirúrgica. Foram tomadas as medições de hiperalgesia térmica após as medições de alodinia táctil. Os resultados desta experiência são mostrados na figura 2, que representa a pontuação acumulativa observada em animais tratados com 35 mg/kg de anticorpo anti-NGF 911 em resposta à estimulação térmica. Estes resultados demonstraram que o tratamento com

anticorpo anti-NGF reduziu significativamente a hiperalgesia térmica pós-cirúrgica.

#### Exemplo 2

#### **Tratamento da dor pós-cirúrgica utilizando um anticorpo anti-NGF humanizado e comparação com tratamento de opióides da dor pós-cirúrgica**

Foi testado o efeito de um anticorpo anti-NGF humanizado designado E3 sobre a dor pós-cirúrgica num modelo animal para a dor pós-cirúrgica tal como foi descrito no exemplo 1. O anticorpo E3 compreende a região constante de IgG2a de cadeia pesada humana que contém as seguintes mutações: A330P331 por S330S331 (numeração de aminoácidos com respeito à sequência de IgG2a de tipo selvagem; veja-se Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624); a região constante kappa de cadeia leve humana; e as regiões variáveis de cadeia leve e pesada mostradas nos quadros 1 e 2.

Foi injectado o anticorpo anti-NGF por via intraperitoneal (i.p.) a diversas concentrações do anticorpo (0,004, 0,01, 0,02, 0,1, 0,6 e 1 mg por quilograma de peso de animal) às 15 horas antes da incisão. O grupo controlo negativo não recebeu anticorpo, mas foi injectada i.p. uma solução salina. Foi injectado i.p. fentanilo a 0,01 mg/kg como controlo positivo 30 minutos antes de testar às 24 horas após a cirurgia. Cada experiência envolveu 8 animais (n=8 por grupo) para cada estado, e o grupo controlo tinha 56 animais. Foi realizada a cirurgia e foi medida uma pontuação de dor acumulativa tal como foi descrito no exemplo 1, excepto que os ratos machos Sprague Dawley foram adquiridos de Harlan (Wisconsin). Foi avaliada a dor em repouso vinte e quatro horas após a cirurgia tal como foi descrito no exemplo 1.

Tal como é mostrado na figura 4, o anticorpo anti-NGF humanizado E3 reduziu significativamente a dor em repouso ( $p < 0,05$ ) após a cirurgia quando foi administrado a uma

dosagem de 0,02 mg/kg a 1 mg/kg. Um "\*" indica uma diferença significativamente significativa do controlo ( $p < 0,05$ ). O tratamento com 0,02 mg/kg aliviou o comportamento de dor pelo menos de maneira tão eficaz como o tratamento com 0,01 mg/kg de fentanilo. Esta dose de fentanilo é 10 vezes a dose humana normal deste potente opióide.

### Exemplo 3

#### **Tratamento antes da cirurgia e depois da cirurgia da dor pós-cirúrgica com um anticorpo anti-NGF**

Foi testada a eficácia de um anticorpo anti-NGF para reduzir a dor pós-cirúrgica quando foi administrado de maneira pós-incisional no modelo animal de dor pós-cirúrgica descrito no exemplo 1, utilizando ratos machos Sprague Dawley adquiridos de Harlan (Wisconsin). Foi injectado por via intravenosa (i.v.) o anticorpo anti-NGF humanizado E3 (0,5 mg/kg) duas horas após a incisão. O grupo controlo não recebeu anticorpo, mas foi injectada i.v. uma solução salina. Foi realizada a cirurgia e foi avaliada a dor em repouso expressa como uma pontuação de dor acumulativa 24 horas após a cirurgia tal como foi descrito no exemplo 1. Tal como é mostrado na figura 5, o tratamento com anticorpo anti-NGF reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a dor em repouso às vinte e quatro horas após a incisão quando foi administrado o anticorpo 2 horas após a incisão. Estes resultados demonstraram que anti-NGF alivia de maneira eficaz a dor pós-cirúrgica quando foi administrado após a cirurgia.

Foi testada a eficácia de um anticorpo anti-NGF para reduzir a dor pós-cirúrgica quando foi administrado 14 dias ou 21 dias antes da incisão no modelo animal descrito no exemplo 1, utilizando ratos machos Sprague Dawley adquiridos de Harlan (Wisconsin). Foi injectado i.p. o anticorpo monoclonal de ratinho anti-NGF 911 a diversas concentrações (1 mg/kg ou 5 mg/kg) aos 14 dias ou 21 dias antes da incisão. Ao grupo controlo foi injectada i.p. uma

solução salina. Foi realizada a cirurgia e foi avaliado a dor em repouso expressa como uma pontuação de dor acumulativa 24 horas após a cirurgia tal como foi descrito no exemplo 1. Tal como é mostrado nas figuras 6 e 7, o anticorpo anti-NGF 911 reduziu significativamente a dor em repouso à dosagem de 5 mg/kg quando foi administrado 14 dias antes da cirurgia, e reduziu a dor em repouso quando foi injectado 21 dias antes da cirurgia.

#### Exemplo 4

#### **O tratamento com anticorpo anti-NGF não mostra nenhum efeito sobre a cicatrização de feridas**

Existem indícios na bibliografia científica de que o tratamento com NGF em excesso pode promover a cicatrização de feridas em animais diabéticos (Matsuda *et al.* (1998) *J. Exp Med* 187(3):297-30) e pele e úlceras das córneas (Lambiase *et al.*, (2003) *Arch Ital Biol.* 141(2-3):141-8). Para determinar se a utilização de anticorpo anti-NGF afectaria à cicatrização de feridas, foi testado o efeito do tratamento com anticorpo anti-NGF sobre a cicatrização de feridas em ratos.

Os ratos machos Sprague-Dawley que pesavam 250-350 gramas foram adquiridos de Harlan (Wisconsin), foram levados à instalação e foram aclimatados durante pelo menos uma semana. Os animais foram anestesiados com isoflurano e na superfície dorsal (costas) os pêlos foram raspados e foi limpo com iodeto de povidona seguido de um tampão de álcool. Foi realizada uma incisão de 2,5 cm através da pele na linha central entre as escápulas. A hemorragia foi controlada com pressão com um tampão de gaze. A ferida foi fechada com quatro únicas suturas ethilon 4-0 e permitiu-se que os animais se recuperassem. Então os animais em três grupos foram divididos: um grupo que recebeu um única dose de anticorpo monoclonal de ratinho anti-NGF 911 no momento de cirurgia (1 mg/kg, i.p.); um grupo que recebeu cetorolac (5 mg/kg diariamente durante cinco dias começando do dia da

cirurgia, por via intramuscular (IMO) como controlo positivo; e um grupo controlo tratado com solução salina (controlo negativo). sabe-se que cetorolac inibe a cicatrização de feridas. Haws et al. (1996) Ann Plast Surg. 37(2):147-51; Gerstenfeld et al. (2003) J Orthop Res. 21(4):670-5.

A zona da incisão foi examinada e fotografada diariamente começando do dia um após a cirurgia. Foram retiradas as suturas no dia 2 após a cirurgia. As incisões foram classificadas como "intacta" se toda a incisão continuava estando fechada e "falha" se alguma parte ou toda a incisão voltava a abrir. Os resultados foram expressos como proporção de feridas intactas (isto é, o número de feridas intactas dividido entre o número total de animais classificados).

Tal como é mostrado na figura 8, a cicatrização de feridas de animais tratados com anticorpo anti-NGF 911 não era significativamente diferente da de animais tratados com solução salina. Portanto, o tratamento com anti-NGF não mostrou nenhum efeito aparente sobre a cicatrização de feridas. Pelo contrário, a cicatrização de feridas foi inibida significativamente em animais tratados com cetorolac quando foi comparado com animais tratados com solução salina ou anticorpo anti-NGF 911 ( $p < 0,0005$ ).

Também foi examinado o aspecto histológico das feridas cicatrizadas em três ratos tratados com anticorpo anti-NGF e três ratos tratados com solução salina. 21 dias após a incisão os animais foram sacrificados e a amostra de pele incluindo a zona da incisão foi fixada em formalina, foi incrustada em parafina e foi seccionada pelo sítio da incisão. Estas secções foram tratadas com anticorpo anti-NGF ou solução salina, foram coloradas com hematoxilina e eosina e foram examinadas por um patologista veterinário com ocultação do tratamento dos animais. Não se observaram anomalias da cicatrização de feridas em nenhum grupo de



ratos.

#### Exemplo 5 - exemplo comparativo

##### **Tratamento da dor pós-cirúrgica com antagonista de NGF de molécula pequena, K252a**

Foi testada a eficácia do antagonista de NGF K252a para tratar a dor pós-cirúrgica no modelo de incisão descrito no exemplo 1. Foi preparada uma solução de 25 mg/ml de K252a em DMSO. A 250 µl desta solução, foram adicionados 3500 µl de uma solução de ciclodextrina a 45% e foi bem misturado. Então foram adicionados 3750 µl de solução salina para preparar uma concentração final de 0,8333 mg/ml de K252a. Os animais (obtidos tal como foi descrito no exemplo 2) receberam a incisão e a dor em repouso foi avaliada tal como foi descrito no exemplo 1. Foi determinada a dor em repouso acumulativo de "avaliação inicial" às 24 horas após a incisão. Então, K252a foi injectado i.p. a 4 mg/kg nos animais de teste, e aos animais controlo foi injectada uma solução de portador (uma solução que continha todos os componentes da solução de K252a excepto K252a). Foram determinadas as pontuações de dor em repouso acumulativo uma hora após o tratamento com K252a ou portador (marcado "1H-P-tmt na figura) e três horas após o tratamento com K252 ou portador (marcado "3H-P-Tmt na figura) por um investigador cego ao tratamento. Tal como é mostrado na figura 9, o tratamento com K252a reduziu significativamente a dor em repouso ( $p < 0,005$ ) às três horas após a dosagem, enquanto que o tratamento com portador não o fez. Estes resultados demonstram que um tratamento com K252a reduziu a dor em repouso até o mesmo grau que o que fez o tratamento com anticorpo anti-NGF em experiências similares.

#### Exemplo 6

##### **Comparação de dor pós-cirúrgica em animais tratados com anticorpo anti-NGF ou anticorpo controlo de isotipo afim**

Com o propósito de demonstrar que o efeito analgésico

do anticorpo anti-NGF requeria a inibição de NGF, foi comparada a eficácia de anticorpo de ratinho anti-NGF 911 para tratar a dor pós-cirúrgica com a eficácia da mesma dose de um anticorpo de murino controlo de isotipo afim que é imunorreagente com a proteína amnésica de *Drosophila*. Foi realizada a experiência como no exemplo 1, excepto que os ratos Sprague-Dawley foram adquiridos de Harlan (Wisconsin). Os ratos foram tratados IP quinze horas antes da cirurgia com 1 mg/kg de ou o anticorpo anti-NGF 911 (marcado "911" na figura) ou anticorpo anti-amnésico de isotipo afim (marcado "amn ab" na figura). Às vinte e quatro horas após a cirurgia, foi avaliada a dor em repouso (pontuação de dor acumulativa) por um observador cego ao tratamento dos animais. Tal como é mostrado na figura 10, o tratamento com anticorpo anti-NGF 911 reduziu significativamente ( $p < 0,005$ ) a dor em repouso em comparação com animais tratados com o anticorpo anti-amnésico. Estes resultados demonstraram que o efeito analgésico do tratamento com anticorpos anti-NGF é específico.

Embora a invenção anterior tenha sido descrita em algum detalhe como forma de ilustração e exemplo para propósitos de clareza de entendimento, as descrições e os exemplos não deveriam ser interpretados como limitativos do alcance da invenção.

#### LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> RINAT NEUROSCIENCE CORP.

<120> MÉTODOS PARA TRATAR A DOR PÓS-CIRÚRGICA PELA ADMINISTRAÇÃO DE UM ANTAGONISTA DO FACTOR DE CRESCIMENTO NERVOSO E COMPOSIÇÕES QUE CONTÊM O MESMO

<130> N.94354 SER

<140> EP 03779091.2

<141> 08-10-2003

<150> PCT/US2003/032089

<151> 08-10-2003

<150> US 60/417.237

<151> 08-10-2002

<160> 2

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 1

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

<210> 2

<211> 110

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 2

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

**DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO**

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

**Documentos de patente referidos na descrição**

- WO 0178698 A, Brennan [0017] [0081]
- WO 9958572 A [0024] [0079] [0088] [0099]
- WO 9809951 A [0024]
- GB 9809951 A [0079] [0088] [0099]
- WO 0164247 A [0081]
- US 5844092 A [0081]
- US 5877016 A [0081]
- US 6153189 A [0081] [0122]
- US 5500362 A [0088]
- US 4816567 A [0098]
- US 5807715 A [0098]
- US 5866692 A [0098]
- US 6331415 B [0098]
- US 5530101 A [0098]
- US 5693761 A [0098]
- US 5693762 A [0098]
- US 5585089 A [0098]
- US 6180370 B [0098]
- EP 0519596 A [0099]
- US 6180377 B [0099]
- US 6054297 B [0099]
- US 5997867 B [0099]
- US 5866692 B [0099]
- US 6210671 B [0099]
- US 6350861 B [0099]
- WO 0127160 A [0099]

- US 5565332 A [0101]
- US 5580717 A [0101]
- US 5733743 A [0101]
- US 6265150 A [0101]
- WO 9306213 A [0101]
- WO 8704462 A [0106]
- US 20010046959 A [0109] [0112] [0123]
- WO 0069829 A [0112]
- WO 9817278 A [0112]
- WO 0217914 A [0112]
- WO 0220479 A [0112]
- US 5342942 A [0112]
- US 6127401 A [0112]
- US 6359130 A [0112]
- US 6291247 B [0112] [0115]
- WO 9715593 A [0115]
- US 6017878 A [0115]
- WO 8909225 A [0115]
- WO 9806048 A [0115]
- US 6436908 B [0116]
- US 6413942 B [0116]
- US 6376471 B [0116]
- WO 9007936 A [0118]
- WO 9403622 A [0118]
- WO 9325698 A [0118]
- WO 9325234 A [0118]
- WO 9311230 A [0118]
- WO 9310218 A [0118]
- WO 9102805 A [0118]
- US 5219740 A [0118]
- US 4777127 A [0118]
- GB 2200651 A [0118]
- EP 0345242 A [0118]
- WO 9412649 A [0118]
- WO 9303769 A [0118]

- WO 9319191 A [0118]
- WO 9428938 A [0118]
- WO 9511984 A [0118]
- WO 9500655 A [0118]
- US 5814482 A [0119]
- WO 9507994 A [0119]
- WO 9617072 A [0119]
- WO 9530763 A [0119]
- WO 9742338 A [0119]
- WO 9011092 A [0119]
- US 5580859 A [0119]
- US 5422120 A [0119]
- WO 9513796 A [0119]
- WO 9423697 A [0119]
- WO 9114445 A [0119]
- EP 0524968 A [0119]
- WO 9721732 A [0123]
- WO 0073344 A [0123]
- WO 0215924 A [0123]
- US 6306849 B [0125]
- US 5766863 A [0127]
- US 5891650 A [0127]
- WO 0053211 A [0142]
- US 5981568 A [0142]
- US 4485045 A [0153]
- US 4544545 A [0153]
- US 5013556 A [0153]
- US 3773919 A [0155]
- EP 03779091 A [0185]
- US 2003032089 W [0185]
- US 60417237 B [0185]

**Literatura não relacionada com patentes referida na descrição**

- **Smeyne et al.** Nature, 1994, vol. 368, 246-249 [0002]

- **Crowley et al.** Cell, 1994, vol. 76, 1001-1011 [0002]
- **Lindsay et al.** Nature, 1989, vol. 337, 362-364 [0002]
- **Chao et al.** Science, 1986, vol. 232, 518-521 [0002]
- **Otten et al.** Eur J Pharmacol., 1984, vol. 106, 199-201 [0003]
- **Otten et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, vol. 86, 10059-10063 [0003]
- **Matsuda et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, vol. 85, 6508-6512 [0003]
- **Pearce et al.** J. Physiol., 1986, vol. 372, 379-393 [0003]
- **Bischoff et al.** Blood, 1992, vol. 79, 2662-2669 [0003]
- **Horigome et al.** J. Biol. Chem., 1993, vol. 268, 14881-14887 [0003]
- **Torcia et al.** Cell, 1996, vol. 85 (3), 345-56 [0003]
- **Leon et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, vol. 91, 3739-3743 [0004]
- **Torcia et al.** Cell, 1996, vol. 85, 345-356 [0004]
- **Di Marco et al.** J. Biol. Chem., vol. 268, 22838-22846 [0004]
- **Ueyama et al.** J. Hypertens., 1993, vol. 11, 1061-1065 [0004]
- **Lindholm et al.** Eur. J. Neurosci., 1990, vol. 2, 795-801 [0004]
- **Kassel et al.** Clin, Exp. Allergy, 2001, vol. 31, 1432-40 [0004]
- **Steiner et al.** Am. J. Physiol., 1991, vol. 261, F792-798 [0004]
- **Schwartz et al.** J Photochem, Photobiol. B, 2002, vol. 66, 195-200 [0004]
- **Bracci-Laudiero et al.** Neuroreport, 1993, vol. 4, 563-565 [0005]
- **Bracci-Laudiero et al.** Neurosci. Lett., 1992, vol. 147, 9-12 [0005]
- **Raychaudhuri et al.** Acta Derm. l'enereol., 1998, vol.



78, 84-86 [0005]

- **Falcimi et al.** Ann. Rheum. Dis., 1996, vol. 55, 745-748 [0005]
- **Okragly et al.** J. Urology, 1991, vol. 161, 438-441 [0005]
- **Braun et al.** Eur. J Immunol., 1998, vol. 28, 3240-3251 [0005]
- **Aloe et al.** Arch. Rheum., 1992, vol. 35, 351-355 [0006]
- **Aloe et al.** Clin. Exp. Rheumatol., 1992, vol. 10, 203-204 [0006]
- **Aloe et al.** Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects, 1993, vol. 15, 139-143 [0006]
- **Amann et al.** Pain, 1996, vol. 64, 323-329 [0007]
- **Andreev et al.** Pain, 1995, vol. 63, 109-115 [0007]
- **Dyck et al.** Neurology, 1997, vol. 48, 501-505 [0007]
- **Petty et al.** Annals Neurol., 1994, vol. 36, 244-246 [0007]
- **Apfel et al.** Mol. Cell. Neurosci., 1996, vol. 7 (2), 134-142 [0007]
- **Michael et al.** J. Neurosci, 1997, vol. 17, 8476-8490 [0007]
- **Hain et al.** Neurosci Lett., 2002, vol. 320 (3), 125-8 [0007]
- **Miletic et al.** Neurosci Lett., 2002, vol. 319 (3), 137-40 [0007]
- **Thompson et al.** Proc Natl Acad Sci USA, 1999, vol. 96 (14), 7714-8 [0007]
- **Lewin et al.** European Journal of Neuroscience, 1994, vol. 6, 1903-1912 [0007]
- **Thompson et al.** Pain, 1995, vol. 62, 219-231 [0007]
- **Lindsay, RM.** J Neurosci., 1988, vol. 8 (7), 2394-405 [0007]
- **Peterson et al.** Neuroscience, 1998, vol. 83, 161-168 [0007]
- **Boettger et al.** Brain, 2002, vol. 125, 252-63 [0007]

- **Kerr et al.** Neuroreport, 2001, vol. 12 (14), 3077-8 [0007]
- **Gould et al.** Brain Res, 2000, vol. 854 (1-2), 19-29 [0007]
- **Chuang et al.** Nature, 2001, vol. 411 (6840), 957-62 [0007]
- **Foster et al.** J Pathol, 2002, vol. 197 (2), 245-55 [0007]
- **Yan et al.** Clin. Sci. (Lond), 1991, vol. 80, 565-569 [0007]
- **Pearce; Thompson.** J. Physiol., 1986, vol. 372, 379-393 [0007]
- **Kawamoto et al.** J. Immunol., 2002, vol. 168, 6412-6419 [0007]
- **Lewin et al.** Eur. J. Neurosci., 1994, vol. 6, 1903-1912 [0007]
- **Woolf et al.** J. Neurosci., 1996, vol. 16, 2716-2723 [0007]
- **Aley et al.** Neuroscience, 1996, vol. 71, 1083-1090 [0007]
- **Yamamoto et al.** Brian Res., 2001, vol. 909 (1-2), 138-144 [0012]
- **Pogatzki et al.** Anesthesiology, May 2002, vol. 96 (5), 1153-1160 [0012]
- **Moiniche et al.** Acta Anaesthesiol. Scand., 1997, vol. 41, 785-9 [0013]
- **Moiniche et al.** Anesthesiology, 2002, vol. 96, 725-41 [0014]
- **Pogatzki et al.** J Neurophysiol, 2002, vol. 87, 721 [0015]
- **De Kock et al.** Pain, 2001, vol. 92, 373-80 [0016]
- Society for Neuroscience Abstracts, 1998, vol. 24 (1-2), 880 [0017] [0122]
- Eur. J. Immunol., 1999, vol. 29, 2613-2624 [0024] [0079] [0082] [0088] [0172]

- **Hongo et al.** Hybridoma, 2000, vol. 19, 215-227 [0025]  
[0026] [0031] [0081] [0092] [0108] [0131] [0165]
- **Sambrook et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0046]
- Oligonucleotide Synthesis. 1984 [0046]
- Methods in Molecular Biology. Humana Press [0046]
- Cell Biology: A Laboratory Notebook. Academic Press, 1998 [0046]
- Animal Cell Culture. 1987 [0046]
- **J.P. Mather; P.E. Roberts.** Introduction to Cell and Tissue Culture. Plenum Press, 1998 [0046]
- Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures. J. Wiley and Sons, 1993 [0046]
- Methods in Enzymology. Academic Press, Inc, [0046]
- Handbook of Experimental Immunology [0046]
- Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells. 1987 [0046]
- Current Protocols in Molecular Biology. 1987 [0046]
- PCR: The Polymerase Chain Reaction. 1994 [0046]
- Current Protocols in Immunology. 1991 [0046]
- Short Protocols in Molecular Biology. Wiley and Sons, 1999 [0046]
- **C.A. Janeway; P. Travers.** Immunobiology. 1997 [0046]
- **P. Finch.** Antibodies. 1997 [0046]
- Antibodies: a practical approach. IRL Press [0046]
- Monoclonal antibodies: a practical approach. Oxford University Press, 2000 [0046]
- **E. Harlow; D. Lane.** Using antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0046]
- The Antibodies. Harwood Academic Publishers, 1995 [0046]
- **Katz et al.** Surg Clin North Am., 1999, vol. 79 (2), 231-52 [0077]
- **Caraceni et al.** J Pain Symptom Manage, 2002, vol. 23 (3), 239-55 [0077]
- Cell. Molec. Biol., 1993, vol. 13, 559-568 [0081]
- **Karlsson, R.; Roos, H.; Fagerstam, L.; Petersson, B.**

- Methods Enzymology, 1994, vol. 6, 99-110 [0090]
- **Kohler, B.; Milstein, C.** Nature, 1975, vol. 256, 495-497 [0096]
  - **Buck, D. W. et al.** In Vitro, 1982, vol. 18, 377-381 [0096]
  - **Winter et al.** Nature, 1991, vol. 349, 293-299 [0099]
  - **Lobuglio et al.** Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1989, vol. 86, 4220-4224 [0099]
  - **Shaw et al.** J Immunol., 1987, vol. 138, 4534-4538 [0099]
  - **Brown et al.** Cancer Res., 1987, vol. 47, 3577-3583 [0099]
  - **Riechmann et al.** Nature, 1988, vol. 332, 323-327 [0099]
  - **Verhocyan et al.** Science, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0099]
  - **Jones et al.** Nature, 1986, vol. 321, 522-525 [0099]
  - **Daugherty et al.** Nucl. Acids Res., 1991, vol. 19, 2471-2476 [0099]
  - **Winter et al.** Annu. Rev. Immunol., 1994, vol. 12, 433-455 [0101]
  - **McCafferty et al.** Nature, 1990, vol. 348, 552-553 [0101]
  - **Johnson, Kevin S.; Chiswell, David J.** Current Opinion in Structural Biology, 1993, vol. 3, 564-571 [0101]
  - **Clackson et al.** Nature, 1991, vol. 352, 624-628 [0101]
  - **Mark et al.** J. Mol. Biol., 1991, vol. 222, 581-597 [0101]
  - **Griffith et al.** EMBO J., 1993, vol. 12, 725-734 [0101]
  - **Marks et al.** Bio/Technol., 1992, vol. 10, 779-783 [0101]
  - **Waterhouse et al.** Nucl. Acids Res., 1993, vol. 21, 2265-2266 [0101]
  - **Peeters et al.** Vaccine, 2001, vol. 19, 2756 [0103]
  - **Lonberg, N.; D. Huszar.** Int.Rev.Immunol, 1995, vol. 13, 65 [0103]
  - **Pollock et al.** J Immunol Methods, 1999, vol. 231, 147 [0103]
  - **Morrison et al.** Proc. Nat. Acad. Sci., 1984, vol. 81,

6851 [0106]

- **Harlow; Lane.** Using Antibodies, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0107]
- **Borsani et al.** Nuc. Acids Res., 1990, vol. 18, 4020 [0109]
- **Ullrich et al.** Nature, 1983, vol. 303, 821-825 [0109]
- **Woolf et al.** J. Neurosci, 2001, vol. 21 (3), 1047-55 [0110]
- **Taglialetela et al.** J Neurochem, 1996, vol. 66 (5), 1826-35 [0110]
- **Li et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, vol. 95, 10884 [0116]
- **Eide et al.** J. Neurosci., 1996, vol. 16, 3123 [0116]
- **Liu et al.** J. Neurosci, 1997, vol. 17, 8749 [0116]
- **Klein et al.** Cell, 1990, vol. 61, 647 [0116]
- **Valenzuela et al.** Neuron, 1993, vol. 10, 963 [0116]
- **Tsoufas et al.** Neuron, 1993, vol. 10, 975 [0116]
- **Lamballe et al.** EMBO J, 1993, vol. 12, 3083 [0116]
- **Findeis et al.** Trends Biotechnol., 1993, vol. 11, 202 [0117]
- **Chiou et al.** Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer. 1994 [0117]
- **Wu et al.** J. Biol. Chem., 1988, vol. 263, 621 [0117]
- **Wu et al.** J. Biol. Chem., 1994, vol. 269, 542 [0117]
- **Zenke et al.** Proc. Natl. Acad Sci. USA, 1990, vol. 87, 3655 [0117]
- **Wu et al.** J. Biol. Chem., 1991, vol. 266 (338 [0117]
- **Jolly.** Cancer Gene Therapy, 1994, vol. 1, 51 [0117]
- **Kimura.** Human Gene Therapy, 1994, vol. 5, 845 [0117]
- **Connelly.** Human Gene Therapy, 1995, vol. 1, 185 [0117]
- **Kaplitt.** Nature Genetics, 1994, vol. 6, 148 [0117]
- **Curriel.** Hum. Gene Ther., 1992, vol. 3, 147 [0118] [0119]
- **Wu.** J. Biol. Chem., 1989, vol. 264, 16985 [0119]
- **Philip.** Mol. Cell Biol., 1994, vol. 14, 2411 [0119]
- **Woffendin.** Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, vol. 91, 1581

[0119]

- **Knusel et al.** J. Neurochem., 1992, vol. 59, 715-722  
[0125]
- **Knusel et al.** J. Neurochemistry, 1991, vol. 57, 955-962  
[0125]
- **Koizumi et al.** J. Neuroscience, 1988, vol. 8, 715-721  
[0125]
- **Hirata et al.** Chemical Abstracts, vol. 111, 728 [0125]
- **Urfer et al.** Biochem., 1997, vol. 36, 4775-4781 [0130]
- **Tsoulfas et al.** Neuron, 1993, vol. 10, 975-990 [0130]
- **Levi-Montalcini, R.; Angeletti, P.** Nerve growth factor. Physiol. Rev., 1968, vol. 48, 534-569 [0130]
- **Chun; Patterson.** Dev. Biol., 1977, vol. 75, 705-711  
[0130]
- **Buchman; Davies.** Development, 1993, vol. 118, 989-1001  
[0130]
- **Remington:** The Science and Practice of Pharmacy. Lippincott Williams and Wilkins, 2000 [0134]
- **Remington.** The Science and Practice of Pharmacy. Mack Publishing, 2000 [0143] [0152] [0154]
- **Epstein et al.** Proc. Natl. Acad Sci. USA, 1985, vol. 82, 3688 [0153]
- **Hwang et al.** Proc. Natl Acad Sci. USA, 1980, vol. 77, 4030 [0153]
- **Brennan et al.** Pain, 1996, vol. 64, 493-501 [0167]
- **Matsuda et al.** J. Exp Med, 1998, vol. 187 (3), 297-30  
[0177]
- **Lambiase et al.** Arch Ital Biol., 2003, vol. 141 (2-3), 141-8 [0177]
- **Haws et al.** Ann Plast Surg., 1996, vol. 37 (2), 147-51  
[0178]
- **Gerstenfeld et al.** J Orthop Res., 2003, vol. 21 (4), 670-5  
[0178]

**REIVINDICAÇÕES**

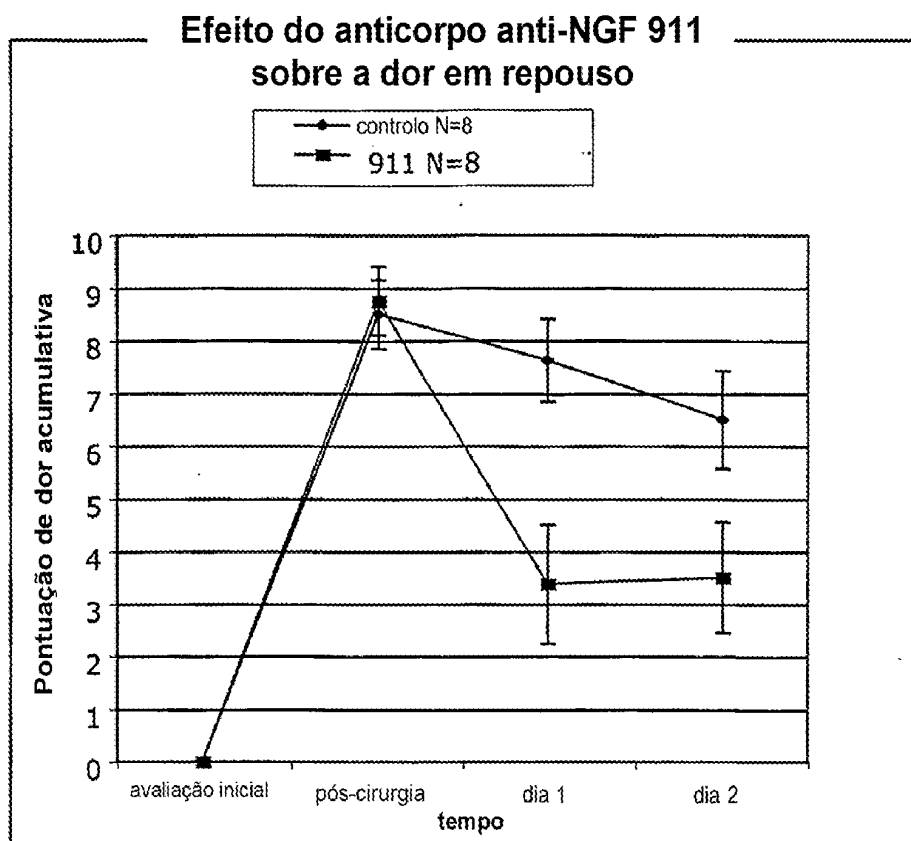
1. Um anticorpo anti-NGF para a utilização no tratamento da dor pós-cirúrgica.
2. Um anticorpo anti-NGF de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo anti-NGF é para a utilização na supressão ou melhoria da dor em repouso.
3. Um anticorpo anti-NGF de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo anti-NGF é para a utilização na supressão ou melhoria da dor induzida mecanicamente.
4. Um anticorpo anti-NGF de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o anticorpo anti-NGF é um anticorpo humano.
5. Um anticorpo anti-NGF de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o anticorpo anti-NGF é um anticorpo humanizado.
6. Um anticorpo anti-NGF de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o anticorpo anti-NGF se liga a NGF humano.
7. Um anticorpo anti-NGF de acordo com a reivindicação 6, em que o anticorpo anti-NGF se liga a NGF humano com uma afinidade de ligação de aproximadamente 0,1 nM.
8. Um anticorpo anti-NGF de acordo com a reivindicação 6, em que o anticorpo anti-NGF se liga a NGF humano com uma afinidade de ligação de entre aproximadamente 2 pM e 22 pM.
9. Um anticorpo anti-NGF de acordo com a reivindicação 8, em que o anticorpo anti-NGF se liga a um epítipo de NGF que

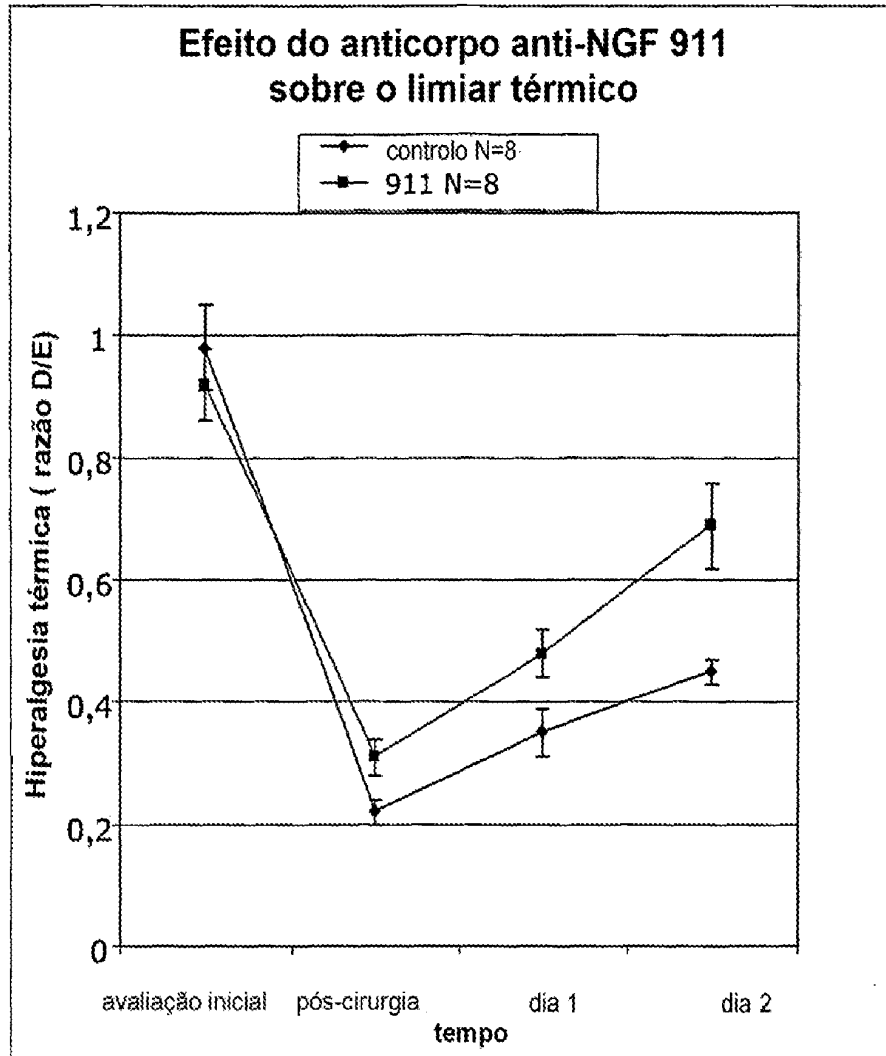
compreende um ou mais: resíduos K32, K34 e E35 dentro da região variável 1 (aminoácidos 23-35) de hNGF, resíduos F79 e T81 dentro da região variável 4 (aminoácidos 81-88) de hNGF; resíduos H84 e K88 dentro da região variável 4; resíduo R103 entre a região variável 5 (aminoácidos 94-98) de hNGF e a extremidade C-terminal (aminoácidos 111-118) de hNGF; resíduo E11 dentro da região pré-variável 1 (aminoácidos 10-23) de hNGF; Y52 entre a região variável 2 (aminoácidos 40-49) de hNGF e a região variável 3 (aminoácidos 59-66) de hNGF; resíduos L112 e S113 dentro da extremidade C-terminal de hNGF; resíduos R59 e R69 dentro da região variável 3 de hNGF; ou resíduos V18, V20 e G23 dentro da região pré-variável 1 de hNGF.

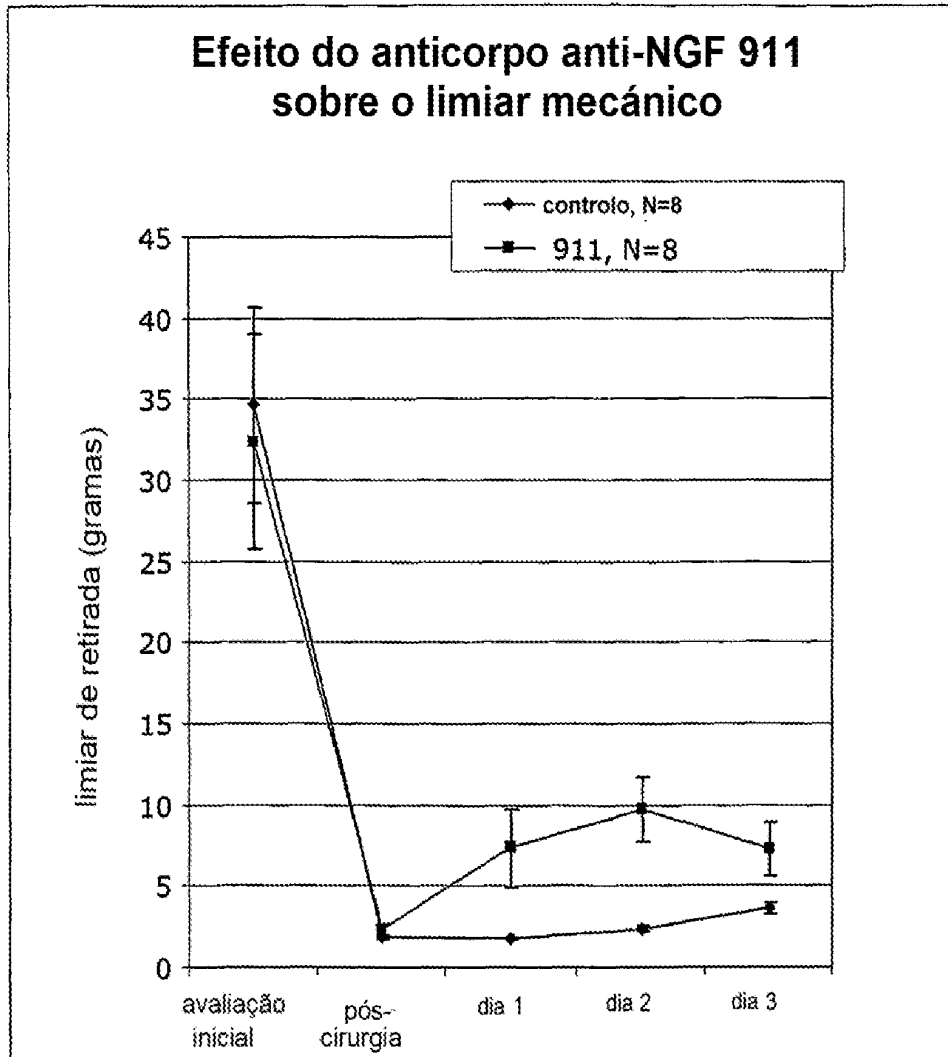
10. Utilização de um anticorpo anti-NGF no fabrico de um medicamento para tratar a dor pós-cirúrgica.

11. Uma composição farmacêutica para a utilização no tratamento da dor pós-cirúrgica que compreende um anticorpo anti-NGF e um veículo farmacêuticamente aceitável.

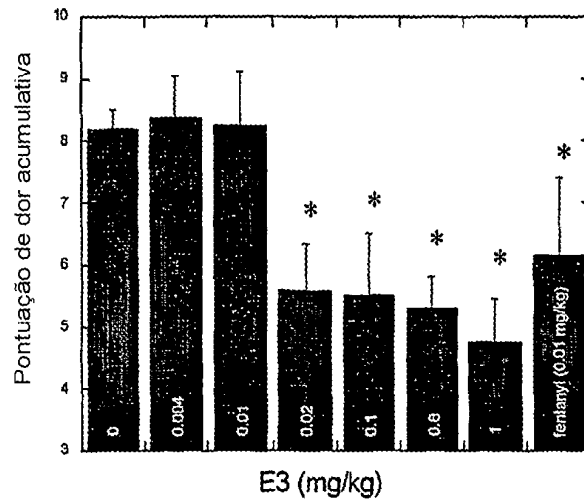


**FIGURA 1**

**FIGURA 2**

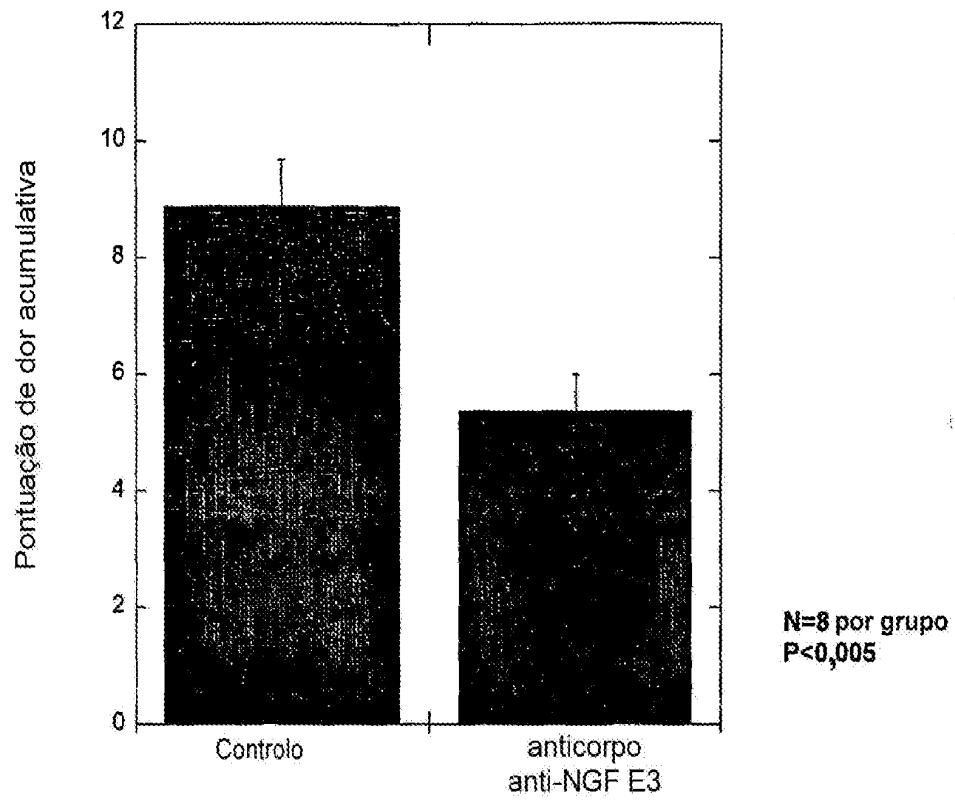
**FIGURA 3**

Anticorpo anti-NGF humanizado E3  
melhora a dor pós-cirúrgica

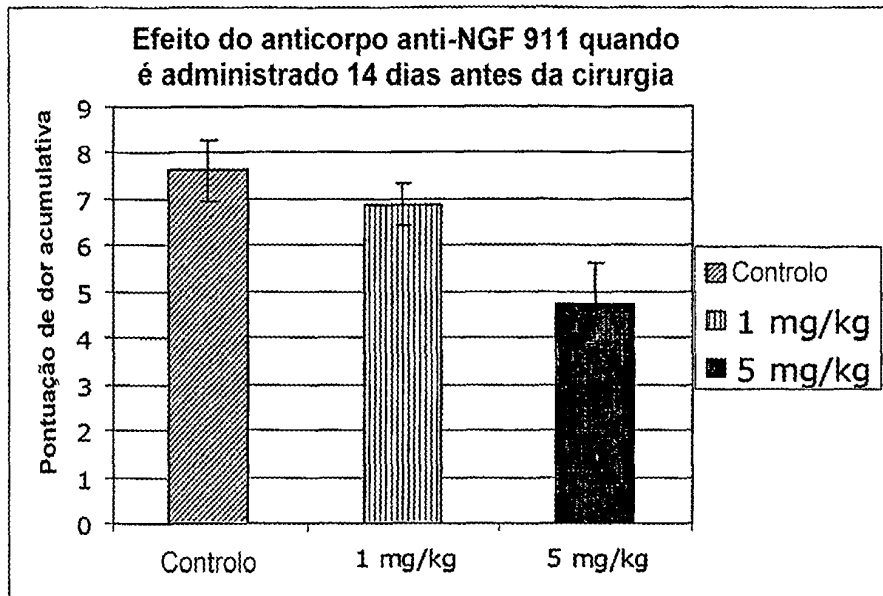


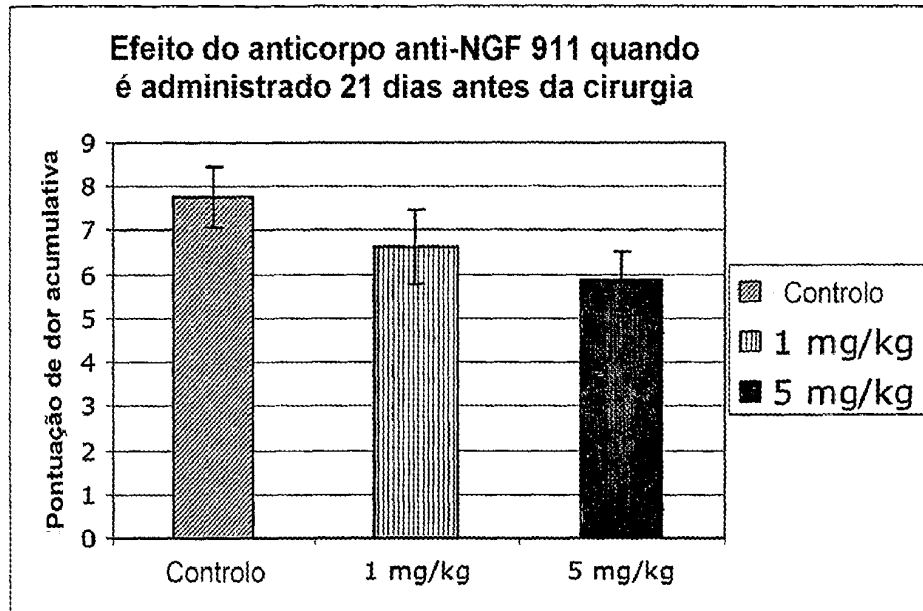
**FIGURA 4**

Anticorpo anti-NGF E3 alivia a dor quando é injectado duas horas depois da cirurgia

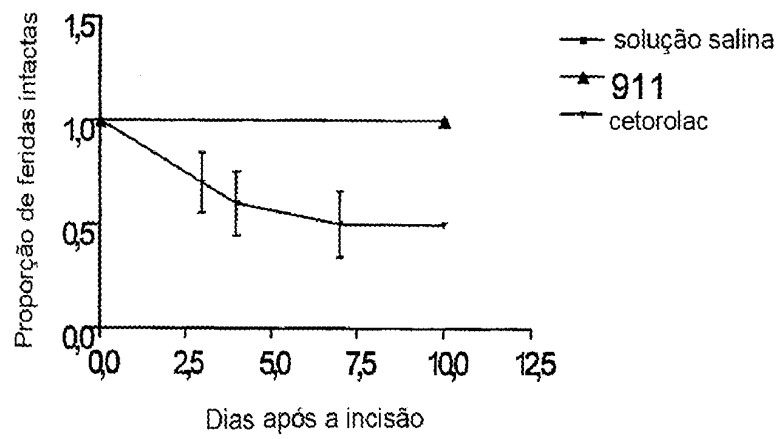


**FIGURA 5**

**FIGURA 6**

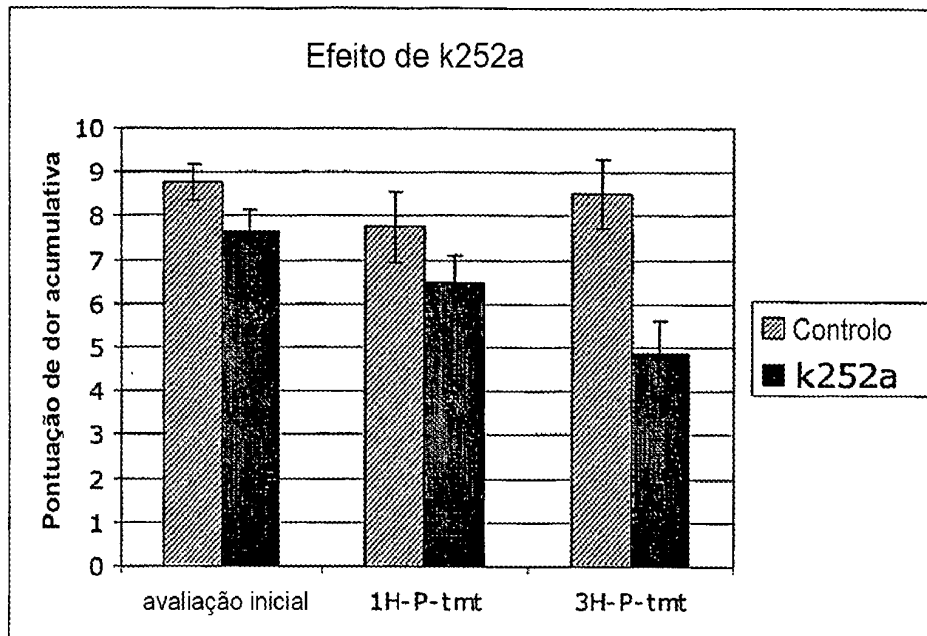
**FIGURA 7**

Proporção de feridas intactas após incisão e tratamento com solução salina, anticorpo anti-NGF 911 ou ceterolac

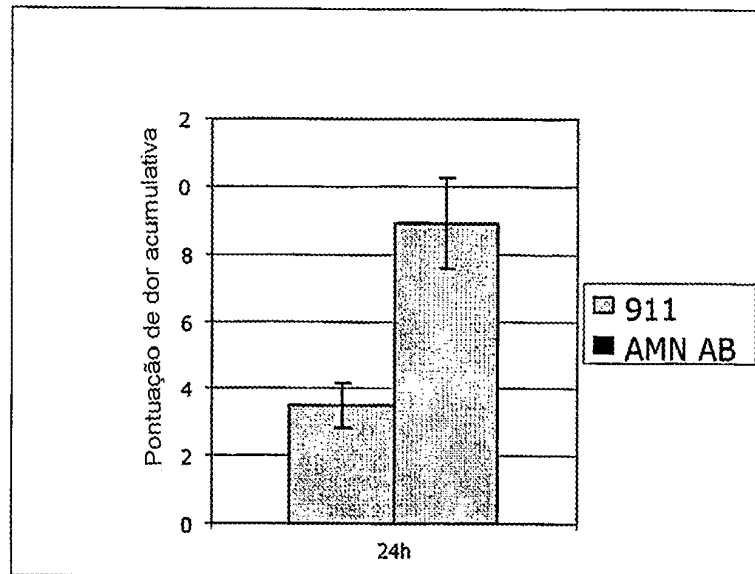


**FIGURA 8**



**FIGURA 9**

O efeito analgésico do tratamento com anticorpo anti-NGF  
é específico



**FIGURA 10**