

(11) Número de Publicação: **PT 2252633 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/28 (2013.01) **A61K 39/395** (2013.01)

A61P 25/00 (2013.01) **A61P 29/00** (2013.01)

A61P 43/00 (2013.01) **C12N 15/13** (2013.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2009.02.04**

(30) Prioridade(s): **2008.02.04 US 25995 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.11.24**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.08.14**
221/2013

(73) Titular(es):

LAY LINE GENOMICS S.P.A.

VIA FONTEIANA 66 00152 ROME

IT

(72) Inventor(es):

FABIO BENIGNI

DANIELE D'AMBROSIO

IT

(74) Mandatário:

MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA

RUA DOS BACALHOEIROS, 4 1100-070 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: ANTICORPOS ANTI-TRKA E SEUS DERIVADOS

(57) Resumo:

PROPORCIONA-SE UM ANTICORPO ANTI-TRKA QUE COMPREENDE: A) UMA CADEIA PESADA VARIÁVEL CONTENDO UMA SEQUÊNCIA SELECIONADA ENTRE QUALQUER UMA DAS BXVH1, BXVH2, BXVH3, BXVH4, BXVH5 OU HUVHWOV, COMO MOSTRA A FIGURA (1A), OU ENTRE VARIANTES DE QUALQUER DAS SEQUÊNCIAS REFERIDAS E/OU B) UMA CADEIA LEVE VARIÁVEL CONTENDO UMA SEQUÊNCIA SELECIONADA ENTRE QUALQUER UMA DAS BXHVL1, BXHVL2, BXHVL3, BXHVL4, BXHVL5, BXHVL6, BXHVL7 OU BXHVL8, COMO MOSTRA A FIGURA (1B), OU ENTRE VARIANTES DE QUALQUER DAS SEQUÊNCIAS REFERIDAS. PROPORCIONA-SE IGUALMENTE DERIVADOS DE LIGAÇÃO A TRKA. OS ANTICORPOS OU DERIVADOS DA PRESENTE INVENÇÃO SÃO ÚTEIS EM VÁRIAS TERAPIAS, INCLUINDO TERAPIA DA DOR.

RESUMO

ANTICORPOS ANTI-TRKA E SEUS DERIVADOS

Proporciona-se um anticorpo anti-TrkA que compreende: a) uma cadeia pesada variável contendo uma sequência selecionada entre qualquer uma das BXhVH1, BXhVH2, BXhVH3, BXhVH4, BXhVH5 ou HuVHW0v, como mostra a Figura (1a), ou entre variantes de qualquer das sequências referidas e/ou b) uma cadeia leve variável contendo uma sequência selecionada entre qualquer uma das BXhVL1, BXhVL2, BXhVL3, BXhVL4, BXhVL5, BXhVL6, BXhVL7 ou BXhVL8, como mostra a figura (1b), ou entre variantes de qualquer das sequências referidas. Proporciona-se igualmente derivados de ligação a TrkA. Os anticorpos ou derivados da presente invenção são úteis em várias terapias, incluindo terapia da dor.

DESCRIÇÃO

ANTICORPOS ANTI-TRKA E SEUS DERIVADOS

A presente a invenção refere-se a anticorpos e seus derivados, especialmente a anticorpos humanizados e seus derivados.

O factor de crescimento neural (NGF) actua através de dois receptores de membrana. Um é o receptor p72 de afinidade relativamente baixa. O outro é um receptor de 140 KDa de afinidade elevada, conhecido como TrkA.

O NGF tem uma potencial utilização no tratamento de uma vasta gama de distúrbios, tais como vários distúrbios neurodegenerativos (incluindo a doença de Alzheimer), diabetes e lepra.

Contudo, o NGF pode ter várias propriedades agonistas indesejáveis. Estas incluem um aumento da sensibilidade à dor. O sistema NGF-TrkA proporciona um potencial alvo para terapias de dor.

Foram produzidos vários anticorpos anti-TrkA. Um antícorpo deste tipo é um antícorpo monoclonal que é referido como 5C3 em WO 97/21732 (McGill University). Contudo, descobriu-se que era um agonista de TrkA e, por conseguinte, não é útil para reduzir a dor. Especificamente, quando ligado a TrkA, este antícorpo não impede a sua activação funcional.

Um antícorpo monoclonal anti-TrkA conhecido como MNAC13 é descrito em WO 00/73344 (Societa Italiana Per La Ricerca Scientifica), da qual deriva a EP-B-118138 (Lay Line Genomics SpA). Este antícorpo e vários dos seus derivados são considerados eficazes a impedir a activação funcional

de TrkA numa série de sistemas biológicos. O anticorpo monoclonal MNAC13 foi usado num teste de nocicepção padrão e descobriu-se que proporciona notável hipoalgesia.

Uma variante Fv (ScFv) de cadeia simples deste anticorpo está também descrita em WO 00/73344 e é aí referida como MNAC13 ScFv. Esta variante contém as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas do anticorpo maior, ligadas entre si por um polipéptido ligante que une o terminal C da região VL com o terminal N da região VH. Descobriu-se que esta variante se liga a TrkA tão eficientemente como o MNAC13. A sequência das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas foi comparada com a das regiões correspondentes do anticorpo descrito em WO 97/21732 e verificou-se que, em termos globais, a identidade de sequência entre elas era apenas de baixo nível.

O documento WO 06/131952 (Lay Line Genomics SpA) descreve utilizações médicas dos anticorpos anti-TrkA no tratamento de dor crónica. Apresenta provas dessas utilizações através do uso de modelos de dor persistente, em particular o modelo de Lesão por Constrição Crónica (CCI).

O documento WO 06/137106 (Lay Line SpA Genomics) descreve o uso de um anticorpo anti-TrkA capaz de inibir a ligação entre NGF e TrkA em combinação com pelo menos um analgésico opiáceo para o tratamento ou prevenção da dor. É explicado que esta terapia combinada permite uma dosagem de opiáceo reduzida para proporcionar o mesmo nível de alívio de dor que uma dosagem muito mais elevada. Isto pode portanto ser útil na redução de efeitos secundários de opiáceos na terapia da dor, pois as dosagens podem ser reduzidas.

O documento WO 05/061540 (Lay Line Genomics SpA & Scuolo Internazionale Superiore Di Studi Avanzati-Sissa) descreve um método de humanização de anticorpos no qual se utilizam dados estruturais, obtidos a partir de estudos de cristalografia, para conduzir às primeiras etapas da concepção da humanização. Como exemplos, o documento WO 05/061540 usa anticorpos anti-TrkA, como descrito em WO 00/73344, e anticorpos anti-NGF como pontos de partida e em seguida reestrutura-os utilizando o método descrito.

Embora os anticorpos humanizados descritos em WO 05/061540 sejam úteis, é necessário fornecer anticorpos humanizados suplementares para expandir as possibilidades de terapias eficazes.

Os actuais inventores proporcionam agora uma gama de anticorpos anti-TrkA e seus derivados que não está descrita em WO 05/061540. Os inventores também apresentaram dados que indicam a utilidade desses anticorpos. Antes da presente invenção, estes anticorpos não eram simplesmente conhecidos na técnica e os dados apresentados não podiam ter sido previstos.

De acordo com um aspecto da presente descrição, proporciona-se um anticorpo anti-TrkA que compreende:

- a) uma cadeia pesada variável que compreende uma sequência selecionada entre uma qualquer das BXhVH1 (SEQ ID NO 1), BXhVH2 (SEQ ID NO 2), BXhVH3 (SEQ ID NO 3), BXhVH4 (SEQ ID NO 4), BXhVH5 (SEQ ID NO 5) ou HuVHWov (SEQ ID NO 6), como se mostra na figura 1a; ou entre variantes de qualquer das sequências referidas; e/ou

b) uma cadeia leve variável que compreende uma sequência selecionada entre uma qualquer das BXhVL1 (SEQ ID NO 7), BXhVL2 (SEQ ID NO 8), BXhVL3 (SEQ ID NO 9), BXhVL4 (SEQ ID NO 10), BXhVL5 (SEQ ID NO 11), BXhVL6 (SEQ ID NO 12), BXhVL7 (SEQ ID NO 13) ou BXhVL8 (SEQ ID NO 14); ou entre variantes de qualquer das sequências referidas.

Proporciona-se igualmente um derivado do anticorpo referido; sendo esse derivado capaz de se ligar a TrkA.

Com maior preferência, o anticorpo compreende, tanto uma cadeia pesada variável como descrito acima em a), como uma cadeia leve variável como descrito na parte b), i.e. compreende uma das combinações seguintes de cadeias leves e pesadas:

BXhVH1VL1, BXhVH1VL2, BXhVH1VL3, BXhVH1VL4, BXhVH1VL5,
BXhVH1VL6, BXhVH1VL7, BXhVH1VL8,

BXhVH2VL1, BXhVH2VL2, BXhVH2VL3, BXhVH2VL4, BXhVH2VL5,
BXhVH2VL6, BXhVH2VL7, BXhVH2VL8,

BXhVH3VL1, BXhVH3VL2, BXhVH3VL3, BXhVH3VL4, BXhVH3VL5,
BXhVH3VL6, BXhVH3VL7, BXhVH3VL8,

BXhVH4VL1, BXhVH4VL2, BXhVH4VL3, BXhVH4VL4, BXhVH4VL5,
BXhVH4VL6, BXhVH4VL7, BXhVH4VL8,

BXhVH5VL1, BXhVH5VL2, BXhVH5VL3, BXhVH5VL4, BXhVH5VL5,
BXhVH5VL6, BXhVH5VL7, BXhVH5VL8

ou HuVHWOn/HuVLWOn.

Desejavelmente, o derivado do anticorpo tem pelo menos uma região CDR seleccionada entre as regiões sublinhadas nas Figuras 1a e 1b para cada sequência ou entre as suas variantes que não tenham mais do que duas alterações de aminoácidos (de preferência, não mais do que uma alteração de aminoácido), por região sublinhada.

Mais desejavelmente, o derivado tem uma pluralidade de regiões CDR seleccionadas entre as regiões sublinhadas nas Figuras 1a e 1b, para cada sequência, ou entre as suas variantes que não tenham mais do que duas alterações de aminoácidos (de preferência, não mais do que uma alteração de aminoácido), por região sublinhada.

Pode assim compreender uma, duas, três, quatro, cinco ou seis destas regiões CDR (opcionalmente, em combinação com uma ou mais regiões CRD diferentes).

Pode preferencialmente compreender pelo menos a terceira região CRD da cadeia pesada, mas preferencialmente pelo menos a terceira região CDR das cadeias leves e pesadas. É mais desejável contudo, que tenha seis regiões CDR, correspondendo às seis regiões CDR sublinhadas nas Figuras 1a e 1b para cada sequência ou correspondendo a suas variantes que não tenham mais do que duas alterações de aminoácidos por região sublinhada.

Na verdade, na maioria dos casos, é preferível que poucas ou nenhuma alterações sejam feitas às sequências CDR. Assim, uma, duas, três, quatro, cinco, ou mesmo, todas as seis regiões CDR podem ter as mesmas sequências de aminoácidos das que se mostram nas Figuras 1a e 1b.

Passando agora às regiões estruturais, prefere-se que o derivado tenha pelo menos uma região estrutural selecionada entre as sequências não sublinhadas apresentadas nas Figuras 1a e 1b ou entre as suas variantes que tenham pelo menos 75% de identidade de sequência de aminoácidos entre si (por exemplo, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência entre si).

O grau de identidade de sequência de aminoácidos pode ser determinado por simples alinhamento das sequências, sem quaisquer lacunas, e determinação das diferenças entre as sequências.

As sequências podem ser alinhadas de acordo com o esquema de numeração de Kabat e as identidades de sequência podem então ser determinadas de acordo com isso (ver Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda MD, 1987 & 1991). Este esquema de numeração é discutido em WO 05/061540 (pode também fazer-se referência a Chothia & Lesk, J. Mol. Biol., 196, 901 (1987) e a Chothia et al., Nature, 342, 878 (1989)).

Menos preferencialmente, podem permitir-se uma ou mais lacunas (por exemplo, para uma ou mais inserções/deleções de aminoácidos), podendo depois ser atribuídas penalizações pelas lacunas.

A identidade de sequência pode ser determinada usando um software de análise de sequências, por exemplo, BLASTN ou BLASTP (disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Os parâmetros padrão para comparar duas sequências (por exemplo, "Blast"ar duas sequências uma relativamente à

outra) pelo BLASTN (para sequências nucleotídicas) são: recompensa por coincidir = 1, penalização por não coincidir = 2, grande lacuna = 5, lacuna de extensão = 2. Quando se usa o BLASTP para sequências de proteínas, os parâmetros padrão são: recompensa por coincidir = 0, penalização por não coincidir = 0, lacuna aberta = 11, lacuna de extensão = 1.

Mais preferivelmente, está presente uma pluralidade de regiões estruturais e estas regiões são selecionadas entre as sequências não sublinhadas apresentadas nas Figuras 1a e 1b ou entre as suas variantes que tenham pelo menos 75% de identidade de sequência de aminoácidos entre si (por exemplo, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de identidade de sequência).

Cada cadeia apresentada nas Figuras 1a e 1b tem quatro regiões estruturais. Assim, é preferível que estejam presentes pelo menos duas, pelo menos três ou quatro destas regiões/suas variantes.

Com maior preferência, estão presentes todas as quatro regiões estruturais ou suas variantes.

Quando estão presentes uma ou mais regiões estruturais variantes, é geralmente preferível que essas regiões não incluam substituições de aminoácidos que resultem numa alteração para um aminoácido que está presente num sequência de murino numa posição correspondente.

Os aminoácidos de murino relevantes que podem ser usados para comparação são apresentados em mVHEP e mVLEP nas Figuras 1a e 1b, respectivamente, com a exceção de que,

para efeitos desta discussão, os poucos aminoácidos em itálico apresentados em mVHEP e mVLEP são considerados não serem de murino. Nestas posições, os resíduos considerados como sendo de murino são dados na tabela abaixo, na ordem pela qual os resíduos em itálico aparecem nas Figuras.

Posição	Resíduo em itálico mostrado na Figura	Resíduo murino correspondente
Cadeia pesada	M	V
Cadeia pesada	Q	G
Cadeia leve	D	Q
Cadeia leve	S	T

Assim, a percentagem de humanização de uma ou mais regiões estruturais pode ser reduzida por substituições de aminoácidos que não aumentam necessariamente a percentagem de resíduos de murino presentes.

Estes podem resultar de substituições conservativas de aminoácidos não murinos e/ou de substituições não conservativas de não murinos.

Contudo, são preferíveis as substituições conservativas.

Os aminoácidos podem ser agrupados da seguinte forma:

Grupo I (cadeias laterais hidrofóbicas): M, A, V, L, I;

Grupo II (cadeias laterais hidrofílicas neutras): C, S, T, N, Q;

Grupo III (cadeias laterais ácidas): D, E;

Grupo IV (cadeias laterais básicas): K, R;

Grupo V (resíduos que influenciam a orientação da cadeia principal): G, P; e

Grupo VI (cadeias laterais aromáticas): F, Y, W.

Substituições de aminoácidos conservativas envolvem substituições entre aminoácidos do mesmo grupo, enquanto que substituições de aminoácidos não conservativas implicam uma troca entre membros de grupos diferentes.

Quaisquer que sejam as sequências presentes nas diferentes regiões das cadeias leves e/ou pesadas, é preferível que um anticorpo ou derivado da presente invenção tenha certas características funcionais.

Além de se ligar a TrkA, é preferível que um anticorpo ou um derivado da presente invenção seja capaz de bloquear ou reduzir a ligação de NGF a TrkA.

De preferência, é capaz de bloquear ou reduzir uma ou mais actividades biológicas que iriam, de outro modo, ser induzidas pela ligação de NFG ao receptor TrkA.

Assim, é preferível que seja um antagonista de uma ou mais actividades induzidas pela ligação de NFG a TrkA (ao invés de ser agonista). Assim, os anticorpos e seus derivados de acordo com a invenção previnem adequadamente a activação funcional de TrkA. A inibição da activação funcional de TrkA por anticorpos e seus derivados pode conduzir a analgesia *in vivo*.

Podem utilizar-se vários procedimentos de ensaio.

Um ensaio padrão é o ensaio PC12 clássico *in vitro*, no qual células PC12 são incubadas com NFG e avaliam-se candidatos para ver se são eficazes em reduzir a extensão do crescimento neurítico induzido por NGF. Este modelo foi usado em WO 00/73344, por exemplo.

Num outro ensaio, no ensaio de ligação TrkA-IgG ilustrado na Figura 2, os anticorpos preferidos geram um valor de DO a 450/630 nm de mais de 0,1 . Com maior preferência, o valor da DO a 450/630 nm é maior que 0,2. Mais preferivelmente, é maior que 0,3.

Num outro ensaio, os anticorpos preferidos ou seus derivados proporcionam um aumento da coloração por FACS de células TF1 no ensaio à base de FACS descrito nos Exemplos (ver Tabela 2). Este aumento é, de preferência, superior a 1,0 vez. Mais preferencialmente, é um aumento que é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2,0 vezes ou pelo menos 2,5 vezes. Com maior preferência, é pelo menos 3,0 vezes.

Ensaios adicionais incluem ensaios para a redução de dor, como descrito anteriormente em relação aos usos médicos da presente invenção (é particularmente desejável, para aplicações médicas, que os anticorpos/seus derivados actuem como antagonistas, em vez de agonistas, em relação à resposta à dor).

Os anticorpos/derivados pretendidos da presente invenção são selectivos pelo facto de se ligarem com maior afinidade a TrkA do que a TrkB (comparar as colunas pretas e brancas da Figura 2, por exemplo).

Por exemplo, eles têm de preferência uma afinidade de ligação que é pelo menos 2 vezes, pelo menos 4 vezes ou pelo menos 6 vezes maior para TrkA do que para TrkB.

Maiores afinidades de ligação para TrkA do que para TrkB resultam em maior selectividade e num menor risco de efeitos secundários indesejados.

As afinidades de ligação podem ser facilmente testadas por ensaios de ligação comparativos, tal como os ilustrados na Figura 2.

Voltando agora aos anticorpos altamente preferidos da presente invenção, estes compreendem uma das combinações seguintes de cadeias leves e pesadas: BXhVH3VL3, BXhVH5VL1 ou BXhVH5VL3.

Estas deram os melhores resultados no ensaio ilustrado na Figura 3.

Derivados preferidos são derivados de BXhVH3VL3, BXhVH5VL1 ou BXhVH5VL3.

A partir da discussão precedente, entender-se-á que se inclui no âmbito da presente invenção uma ampla gama de anticorpos e seus derivados.

Estes possuem numerosas aplicações, incluindo as discutidas abaixo:

Aplicações Médicas

Os anticorpos, ou derivados, da presente invenção podem ser utilizados em medicina.

Podem ser usados para tratar vários distúrbios/patologias, tal como estabelecido em várias categorias abaixo.

A invenção fornece assim um método de tratamento das patologias mencionadas a seguir, que compreende a administração a um sujeito, apropriadamente um mamífero,

especialmente um humano, que dele necessite, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou derivado, tal como aqui descrito, de tal modo que a patologia seja tratada.

A invenção também proporciona utilização para um anticorpo ou derivado, tal como aqui descrito, no fabrico de um medicamento para o tratamento das patologias descritas a seguir.

A invenção também proporciona um *kit* de componentes que comprehende um anticorpo ou um derivado, como aqui descrito, juntamente com instruções que direcccionam a sua utilização por um sujeito para o tratamento das patologias mencionadas a seguir.

Aqui, o termo "tratamento" inclui tratamento terapêutico de um distúrbio/patologia existente. Inclui também tratamento profilático. Inclui ainda a melhoria de um ou mais sintomas adversos, mesmo que o paciente não fique curado de um determinado distúrbio/patologia. Por exemplo, a dor pode ser aliviada ou reduzida.

Dor

Um uso médico preferido é no tratamento da dor.

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor ("IASP"), a dor é geralmente definida como "Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma, real ou potencial, lesão de tecidos ou descrita com base nessa lesão ou ambas". O elemento essencial em todas as formas de dor é a activação de receptores especializados de elevado limiar e de fibras nervosas para avisar o

organismo de potencial lesão de tecido. O envolvimento de células e processos inflamatórios é um elemento comum em muitos estados de dor. O termo "dor aguda" significa dor imediata, geralmente de elevado limiar, provocada por uma lesão como um corte, esmagamento, queimadura ou por estimulação química. O termo "dor crónica", tal como é aqui usado, significa dor que não é dor aguda, de origem tanto inflamatória como neuropática. Entende-se que a dor crónica é muitas vezes de duração relativamente longa, por exemplo, meses ou anos, e pode ser contínua ou intermitente.

Os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados para tratar dor crónica ou dor aguda.

O tratamento da dor crónica é o preferido.

O uso de anticorpos anti-TrkA no tratamento da dor é discutido em WO 00/73344, em WO 05/061540 e em WO 06/131952, por exemplo.

A dor pode estar, por exemplo, associada a qualquer das situações seguintes: pancreatite, pedras nos rins, endometriose, IBD, doença de Crohn, aderências pós-cirúrgicas, pedras na vesícula, dores de cabeça, dismenorreia, dores musculares, entorses, dor visceral, quistos nos ovários, prostatite, cistite, cistite intersticial, dor pós-operatória, enxaqueca, neuralgia do trigéneo, dor provocada por queimaduras e/ou feridas, dor associada a trauma, dor neuropática, dor associada a doenças músculo-esqueléticas, artrite reumatóide, osteoartrite, espondilite anquilosante, patologias periarticulares, dor oncológica, dor de metástases ósseas, infecção por VIH.

São conhecidos vários modelos para avaliar a dor e podem ser usados no rastreio de anticorpos/seus derivados.

Por exemplo, pode usar-se o teste de nocicepção por placa quente, como descrito em WO 00/73344, por exemplo. A experiência pode realizar-se de acordo com McMahon et al., *Nature Medicine*, 1, 774-780 (1995), utilizando o anticorpo/derivado como imunoadesina. O anticorpo/derivado é inoculado subcutaneamente na pata posterior de um rato adulto, durante um período de três semanas, ou através de uma mini-bomba osmótica. A sensibilidade nociceptiva é avaliada em intervalos utilizando o teste da placa quente (Eddy e Leimbach, *J. Phar. Exp. Ther.*, 107, 385-393(1953)), que simula situações de hiperalgesia que se seguem a inflamação ou lesão parcial do nervo. Neste caso, o estímulo nociceptivo induz uma resposta (lamber da pata e/ou saltar) que presume uma coordenação integrada maior do que simples reflexo. De acordo com o teste, o animal é colocado numa gaiola que tem como base uma placa aquecida à temperatura desejada, normalmente 56°C. Mede-se a latência de qualquer das duas respostas (lamber da pata e saltar) em animais de controlo (tratados com anticorpos não relevantes) e nos tratados com o anticorpo/derivado anti-TrkA.

Como alternativa ao teste da placa quente, pode avaliar-se a resposta nociceptiva à formalina. Este teste é descrito por Porro e Cavazzuti em *Prog. Neurobiol.*, 41:565-607 (1993) e foi utilizado em WO 06/137106. Envolve avaliar a redução da resposta à dor por análise de qualquer subsequente redução do lamber da pata quando se administra a formalina, antes do teste, a um determinado candidato. Usa-se habitualmente solução salina como controlo negativo.

O modelo de lesão crónica de constrição (CCI) é também um modelo animal bem conhecido. Envolve constrição crónica do nervo ciático e é usado para a avaliação da dor crónica de natureza neuropática. Este modelo é descrito por Bennett e Xie em Pain, 33, 87-107 (1988). Foi utilizado, por exemplo, em WO 06/131592.

Cancro

Os anticorpos/derivados também podem ser usados no tratamento de cancro.

Vários cancros expressam TrkA. A interacção de TrkA com NGF pode estar envolvida no desenvolvimento de tumores (por exemplo, de cancros da próstata ou do pâncreas). De facto, em certas formas de cancro, um excesso de NGF pode facilitar o crescimento e a infiltração de fibras nervosas. Ao bloquear a acção de NGF, é possível reduzir significativamente a formação de neuromas.

Além disso, como uma alternativa para simplesmente proporcionar um efeito de bloqueio, os anticorpos/derivados podem ser acoplados a um agente citotóxico e podem ser utilizados para atingir as células cancerosas que expressam TrkA, tal como discutido posteriormente em maior detalhe.

Não é contudo necessário acoplar os anticorpos/derivados a toxinas. A ADCC (Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo) surge devido a uma resposta imunitária em que os anticorpos/derivados, ao revestir células alvo, podem torná-las vulneráveis a ataque pelo sistema (por exemplo, por células T, por activação complementar, etc.).

Distúrbios neuronais

Os anticorpos/derivados também podem ser usados no tratamento de vários distúrbios neuronais.

Tal como indicado anteriormente, os anticorpos/derivados podem ser utilizados para reduzir a formação de neuromas.

Podem também ser utilizados no tratamento de distúrbios neurodegenerativos. Tal como discutido anteriormente, o NGF tem um uso potencial no tratamento da doença de Alzheimer, mas tem propriedades agonistas indesejadas, incluindo um aumento da sensibilidade à dor. Os anticorpos/derivados da presente invenção podem ser úteis nesses tratamentos para reduzir os efeitos agonistas indesejados do NGF (ver também a secção abaixo "Terapia de combinação").

Para além disso, os anticorpos/derivados podem ser usados para tratar a dor neuropática, como discutido acima. Essa dor pode estar associada a uma lesão ou disfunção do sistema nervoso.

Distúrbios inflamatórios

Ainda uma outra aplicação é no tratamento de distúrbios inflamatórios.

O NGF é libertado por mastócitos, fibroblastos e outros tipos de células, nos locais periféricos onde ocorrem processos inflamatórios. Em particular, os mastócitos parecem desempenhar um papel fundamental. Produzem NGF e, ao mesmo tempo, expressam receptores TrkA funcionais na sua superfície. O sistema NGF/TrkA parece mediar a activação de mastócitos através de um mecanismo autócrino de *feedback* positivo, que permite amplificação local do sinal

inflamatório algogénico. Exemplos de doenças inflamatórias que podem ser tratadas incluem as formas inflamatórias do trato urinário e da região pélvica, osteoartrite, artrite reumatóide, asma.

Outros distúrbios

Tal como discutido anteriormente, o NGF apresenta um uso potencial no tratamento de diabetes e lepra, mas tem propriedades agonistas indesejadas, incluindo um aumento da sensibilidade à dor. Os anticorpos/derivados da presente invenção podem ser úteis nesses tratamentos para reduzir os efeitos agonistas indesejados do NGF (ver também a secção abaixo “Terapia de combinação”).

Terapia de combinação

Os anticorpos ou seus derivados da presente invenção podem ser usados em conjunto com um ou mais agentes activos diferentes em terapia de combinação. Podem ser usados para administração simultânea, sequencial ou concertada em medicina.

Por exemplo, o antícorpo ou derivado pode ser combinado com um opiáceo analgésico. O documento WO 06/137106 demonstra que pequenas quantidades de moléculas capazes de bloquear a actividade biológica de TrkA podem potenciar os efeitos analgésicos dos opiáceos.

Esses opiáceos incluem um ou mais compostos seleccionados entre os seguintes: morfina, codeína, di-hidrocodeína, diacetilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, levorfanol, oximorfona, alfentanilo, buprenorfina, butorfanol, fentanil, sulfentanil, meperidina, metadona, nabulfina,

propoxifeno, pentazocina e os seus derivados farmaceuticamente aceitáveis (por exemplo, os seus sais farmaceuticamente aceitáveis).

Alternativamente, os anticorpos ou derivados podem ser usados em terapia de combinação com um ou mais analgésicos não opiáceos.

Uma outra combinação é a do anticorpo ou derivado com NGF. Como discutido acima, foi proposto o uso de NGF no tratamento de várias doenças, incluindo a doença de Alzheimer, diabetes mellitus, lepra, etc., mas tem-se observado aumento na sensibilidade à dor, decorrente de propriedades agonistas em relação a alvos periféricos. De novo, através do uso de um anticorpo ou derivado da presente invenção, a sensibilidade à dor pode ser reduzida, tornando assim as terapias à base de NGF mais atractivas.

Um outra combinação é a de um ou mais anticorpos ou derivados da presente invenção em conjunto com um ou mais anticorpos diferentes. Uma combinação preferível é com um ou mais anticorpos anti-TrkA ou anti-NGF diferentes. Tais combinações podem proporcionar maior eficácia no tratamento de um ou mais dos distúrbios aqui discutidos relativamente a tratamentos com um só anticorpo. Por exemplo, podem utilizar-se combinações de dois ou mais anticorpos que demonstraram estar entre as mais eficazes em procedimentos de ensaio aqui usado.

Composições farmacêuticas, veículos e vias de administração

Os anticorpos/derivados da presente invenção podem ser administrados por qualquer via adequada.

Estas incluem (sem a elas se limitarem) intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subcutânea, intratraqueal, oral, entérica, parentérica, intranasal ou administração dérmica.

Assim, a invenção proporciona uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo ou seu derivado em conjunto com um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

Os anticorpos/derivados podem, especificamente, ser administrados, para aplicação local, por injecção (intraperitoneal ou intracraniana, especialmente num ventrículo cerebral, ou intrapericárdica ou intrabursal) de formulações líquidas ou por ingestão de formulações sólidas (sob a forma de comprimidos, pastilhas, cápsulas) ou formulações líquidas (sob a forma de emulsões e soluções).

As composições para administração parentérica compreendem geralmente uma solução da imunoglobulina dissolvida numa solução compatível, de preferência aquosa. A concentração de anticorpo/derivado nestas formulações pode variar entre menos de 0,005% e 15-20% m/v. É seleccionada principalmente de acordo com o modo particular de administração pretendido. Alternativamente, os anticorpos/derivados podem ser preparados para administração na forma sólida. Os anticorpos podem ser combinados com diferentes substâncias inertes ou excipientes, que podem incluir ligantes, tais como celulose microcristalina, gelatina ou goma-arábica; receptores, tais como lactose ou amido; agentes tais como ácido algínico, Primogel ou amido de milho; lubrificantes como estearato de magnésio, dióxido de silício coloidal; edulcorantes tais como sacarose ou sacarina; ou aromatizantes, tais como hortelã, salicilato de metilo. Outros sistemas de administração farmacêutica incluem

hidrogel, hidroximetilcelulose, lipossomas, microcápsulas, micro-emulsões, microsferas, etc.

Injecções locais directamente num local afectado por um distúrbio, ou perto dele, são um modo de administração preferido se o distúrbio for localizado.

Em contraste com terapias anti-tumorais, o documento WO 06/131952 discute o uso de vários anticorpos anti-TrkA no tratamento da dor.

Aqui, é explicado que os anticorpos anti-TrkA são adequadamente administrados sistemicamente. A administração sistémica pode ser realizada por injecção, por exemplo, infusão intravenosa contínua, infusão intravenosa em bólus, injecção subcutânea ou intramuscular. Em alternativa, podem usar-se outras formas de administração (por exemplo, oral, por via mucosa, por inalação, por via sublingual, etc.).

Se desejado, contudo, o fornecimento do anticorpo/derivado pode ser realizado por administração local (por exemplo, injecção intra-articular, subcutânea, intramuscular) na proximidade dos tecidos afectados.

Os anticorpos/derivados anti-TrkA serão adequadamente formulados numa composição farmacêutica apropriada para a via de administração pretendida. Soluções para injecção irão adequadamente conter o anticorpo/derivado dissolvido ou disperso num meio aquoso (por exemplo, água para injecção), como adequado, contendo tampões adequados e modificadores de molaridade (por exemplo, fosfato, sal e/ou dextrose).

O regime de tratamento (i.e. dose, momento da administração e repetição) pode ser representado por uma única administração ou por administrações repetidas (por exemplo, injecções) do produto pela via de administração escolhida.

O intervalo de administração das doses pode ser sujeito a modificações, dependendo da extensão e duração da resposta clínica, bem como do indivíduo em particular e da sua história clínica.

Adequadamente, o anticorpo/derivado anti-TrkA tem um período de acção longo. Em particular, o efeito clínico do anticorpo depois da administração pode durar até 21 dias, como se determina a partir de estudos com animais. Para além disso, os anticorpos/derivados podem manifestar benefícios clínicos por um período maior do que aquele em que a sua presença pode ser detectada numa matriz biológica relevante, tal como soro ou plasma, após a sua administração.

Com vista ao longo período de acção pretendido (i.e. adequadamente, um efeito que dure pelo menos uma semana ou, de preferência, pelo menos duas semanas, por exemplo, pelo menos três semanas ou pelo menos quatro semanas), adequadamente, o anticorpo/derivado pode ser administrado a sujeitos numa frequência inferior a uma vez por semana, por exemplo, não mais do que uma vez em duas semanas ou uma vez a cada três semanas ou uma vez em quatro semanas.

Uma dose diária adequada de anticorpo/derivado anti-TrkA variaria tipicamente desde 0,1 mg/kg até 10 mg/kg de massa corporal.

(Utilizando anticorpos anti-TrkA humanizados e um modelo CCI, é divulgado em WO 06/131592 que se observam propriedades analgésicas consideráveis em animais de laboratório, numa dosagem de 2 mg/kg, apesar de se poderem preferir dosagens mais baixas para humanos.)

Passando agora para a administração relativa a tumores, a administração pode ser através de injecção directa e localizada num tumor ou num tecido perto do local do tumor. Para administração sistémica, as doses variam entre 0,05 mg/kg por dia e 500 mg/kg por dia, apesar de serem preferidas dosagens na região mais baixa deste espectro por serem mais fáceis de administrar. As dosagens podem ser calibradas para, por exemplo, garantir um nível específico do anticorpo/derivado no plasma (na gama de cerca de 5-30 mg/ml, preferencialmente entre 10-15 mg/ml) e manter este nível por um determinado período de tempo até os resultados clínicos serem alcançados.

Métodos eficazes para a medição ou avaliação do estádio de tumores no pâncreas ou na próstata baseiam-se na medição do抗igénio específico da próstata (PSA) no sangue, na medição do tempo de sobrevida para tumores no pâncreas, na medição do abrandamento ou inibição da difusão de metástases, para o caso de ambos os tipos de tumor.

Para injecção directa ao nível do local do tumor, a dosagem depende de diferentes factores, incluindo o tipo, estádio e volume do tumor, assim como muitas outras variáveis.

Dependendo do volume do tumor, as doses terapêuticas típicas podem variar desde injecções de 0,41 mg/ml até 10 mg/ml que podem ser administradas com a frequência adequada.

Qualquer que seja a natureza da terapia, os anticorpos/derivados humanizados podem ser eliminados muito mais lentamente e requerem doses menores para manterem um nível eficaz no plasma do que anticorpos não humanizados. Além disso, com anticorpos/derivados de elevada afinidade, a administração pode ser menos frequente e menos considerável do que com anticorpos que possuam uma afinidade mais baixa.

As dosagens terapeuticamente eficazes de cada anticorpo/derivado podem ser determinadas, durante o tratamento, por um profissional de saúde especializado. Se necessário, as dosagens podem ser reduzidas (por exemplo, para reduzir os efeitos secundários) ou aumentadas (para aumentar a actividade).

Antes da administração, as preparações de anticorpos/derivados da invenção podem ser armazenadas por congelação ou liofilização. Podem depois ser reconstituídas, num tampão adequado, imediatamente antes do uso. Dado que a liofilização e a reconstituição podem resultar numa perda de actividade, os níveis de administração de anticorpo podem ser calibrados para compensar este facto. (Para imunoglobulinas convencionais, os anticorpos IgM tendem a ter uma maior perda da actividade do que os anticorpos IgG). Pode também atribuir-se um prazo de validade para que os anticorpos/derivados não sejam utilizados após um determinado período de armazenamento.

Aplicações de diagnóstico e prognóstico

Um anticorpo ou seu derivado da presente invenção pode ser utilizado no diagnóstico ou prognóstico de qualquer uma das doenças/patologias acima descritas em relação às utilizações médicas.

Pode, por exemplo, ser utilizado para facilitar a detecção de marcadores positivos de TrkA de tumores, como um marcador precoce do surgimento da doença de Alzheimer, etc.

Pode também ser utilizado no diagnóstico de CIPA ("insensibilidade congénita à dor com anidrose"). Esta é uma síndrome hereditária, recessiva, autossómica, caracterizada por episódios recorrentes de febre, anidrose, a ausência de reacção a estímulos nociceptivos, atraso mental e uma tendência para a auto-mutilação. Resulta de mutações no gene de TrkA. De facto, um anticorpo ou derivado da presente invenção pode ser usado no diagnóstico ou prognóstico de uma ampla gama de patologias que envolvam expressão anómala de TrkA (comparado com a expressão de TrkA num indivíduo saudável ou numa amostra de tecido saudável).

A presente invenção inclui, portanto, no seu âmbito, um método que compreende a obtenção de uma amostra biológica obtida a partir de um paciente e o contacto da amostra com um anticorpo ou um derivado da presente invenção.

Se desejado, o anticorpo/derivado pode ser imobilizado. Pode ser fornecido sob a forma de um *kit* de diagnóstico.

O método pode seguidamente incluir a avaliação da ligação do anticorpo/derivado à referida amostra, de uma forma quantitativa ou qualitativa. Se desejado, isto pode ser feito com referência a um controlo positivo (indicando o

estado de saúde) ou a um controlo negativo (indicando a presença/possibilidade de um distúrbio).

Para fins de diagnóstico, os anticorpos/derivados podem ser ambos marcados com um marcador detectável ou podem não ser marcados. (O termo "marcador" é aqui utilizado para incluir marcas ou qualquer outra fracção detectável ou fracção que pode provocar uma alteração detectável.)

Anticorpos não marcados podem ser usados em combinação com outros anticorpos marcados (anticorpos secundários), que são reactivos contra anticorpos humanizados ou humanos (por exemplo, anticorpos específicos para as regiões constantes de imunoglobulinas humanas).

Em alternativa, os anticorpos podem ser marcados directamente. Pode utilizar-se uma grande variedade de marcadores, por exemplo, radionuclídeos, fluoróforos, corantes, enzimas, substratos enzimáticos, factores enzimáticos, inibidores enzimáticos, ligandos, etc.

Em particular, para aplicações de imagem de diagnóstico ou de prognóstico, um agente detectável é conjugado com o anticorpo que é detectável ou marcado com um radioisótopo detectável (por exemplo, um radioisótopo, tal como de iodo, índio, tecnécio) ou de forma paramagnética (com átomos ou iões paramagnéticos, tais como elementos de transição, actinídeos e terras raras, em particular, manganês II, cobre II e cobalto II).

Procedimentos de imagem podem implicar a injecção intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea (em regiões de drenagem linfática, para identificar metástases em gânglios linfáticos) e podem usar detectores de emissões de

radionuclídeos (tais como contadores de cintilação β), no caso de imunocintilografia.

Se, ao invés, for usada uma marcação paramagnética, pode utilizar-se um espectrómetro RMN.

Outras aplicações

Os anticorpos/seus derivados podem ser utilizados como pontos de partida para desenvolver novos anticorpos. Assim, podem ser utilizados como ferramentas de concepção.

Podem ser rastreados por um ou mais ensaios de ligação/funcionais e podem, portanto, fazer parte de um programa de desenvolvimento de fármacos.

Podem ser utilizados para classificação de tecidos, para estudos forenses, etc. Podem ser utilizados como ferramentas de pesquisa.

Podem, por exemplo, serem utilizados para futura investigação em TrkA e/ou em distúrbios em que a ligação de TrkA com NGF (ou outros agentes de ligação a TrkA) possa estar implicada. Podem ser usados para o estudo de ligação e/ou activação

Todas as aplicações dos anticorpos/derivados acima indicadas estão no âmbito da presente invenção

Natureza dos anticorpos e dos derivados de anticorpos

Perante a descrição anterior, entender-se-á que se pode utilizar uma ampla gama de anticorpos e seus derivados na presente invenção.

Para evitar dúvidas, os termos "anticorpos" e "derivados de anticorpos", são discutidos abaixo em maior detalhe.

Anticorpos

Os anticorpos da presente invenção podem estar sob a forma de qualquer estrutura de imunoglobulina pretendida.

São contudo preferidos IgG e IgM, sendo IgG o mais preferido. De entre as isoformas de IgG, prefere-se IgG1, mas podem ser usadas outras formas, incluindo IgG4.

Os anticorpos são quiméricos, i.e. incluem uma ou mais regiões que normalmente não estão associadas entre si na natureza. Mais especificamente, estão presentes uma ou mais regiões CDR derivadas de murino nos anticorpos, mas outras regiões (especialmente regiões constantes) são preferencialmente humanas ou humanizadas.

As regiões humanizadas têm mais resíduos em comum com uma determinada região de imunoglobulina humana do que com a região de imunoglobulina de rato correspondente. Preferivelmente, são pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% idênticas à região humana ao nível da sequência de aminoácidos. Com maior preferência, existe 100% de identidade de sequência sobre uma ou várias regiões não CDR (por exemplo, regiões constantes).

Em alguns casos, contudo, pode ser benéfico introduzir certas mudanças.

Por exemplo, pode ser desejável introduzir alterações que previnam/reduzam uma ou mais das seguintes situações:

- a) activação do sistema complementar;
- b) lise mediada por complemento;
- c) activação de células T;
- d) ligação a um receptor Fc.

As mutações indicadas para permitir que se atinjam um ou mais dos objectivos referidos acima são discutidas em várias patentes. Uma ou mais das ditas mutações podem, portanto, ser incluídas nos anticorpos/derivados da presente invenção.

Por exemplo, a Patente EUA N° 6.194.551 propõe substituições de aminoácidos nas posições de aminoácidos 322, 329 e/ou 331 (usando o sistema de numeração de Kabat) da região da cadeia pesada constante da molécula de IgG e sugere que podem ser usadas para prevenir/reduzir activação indesejada do sistema complementar, mediante a abolição da ligação de Fc a Clq (ver também Ward e Ghetie, Therapeutic Immunology 2: 77-94 (1995)). A Patente EUA N° 6.194.551 mostra que a prolina é conservada na posição 329 na IgG humana. Este resíduo (que é glicosilado e pode, assim, estar envolvido na activação do sistema complementar) é, preferivelmente, substituído por alanina. Contudo, contempla-se a substituição por qualquer outro aminoácido, por exemplo, serina, treonina, asparagina, glicina ou valina. A Patente EUA N° 6.194.551 mostra que a prolina é também conservada na posição 331 da IgG1, IgG2 e IgG3 humanas, mas não da IgG4 (que tem um resíduo de serina na posição 331). O resíduo 331 é preferencialmente substituído por alanina ou outro aminoácido, por exemplo, serina (para regiões IgG diferentes de IgG4), glicina ou valina. Uma

outra possibilidade discutida é a introdução de substituições na posição 322. A lisina 322 é conservada em IgGs humanas e considera-se que este resíduo é preferencialmente substituído por um resíduo de alanina, embora se contemple uma substituição com qualquer outro resíduo de aminoácido (por exemplo, serina, treonina, glicina ou valina).

A Patente EUA N° 6.491.916 revela que mutações na região que abrange aproximadamente da posição 230 à posição 240 de um anticorpo humanizado podem apresentar vantagens particulares. Aqui é explicado que comparações de anticorpos que se ligam a Fc com aqueles que não se ligam a Fc sugerem que alterações nesta região resultam em anticorpos anti-CD3 que não activam células T. Por exemplo, alguns dos anticorpos preferidos compreendem uma mutação na posição 234, na posição 235 ou em ambas. Espera-se que anticorpos anti-CD3 compreendendo uma, duas, três, quatro, cinco ou mais mutações numa ou mais das posições 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 ou 240 apresentem vantagens. Esta patente revela também que um anticorpo com uma região Fc de IgG1, e mutado de forma a ter alanina em ambas as posições 234 e 235, não se liga ao componente Clq do complemento e inicia a cascata mediada pelo complemento. Além disso, é explicado que a mutação de Lys 320 para Gln tem uma afinidade para Clq apenas ligeiramente mais fraca do que o tipo selvagem, mas não é lítica.

A Patente EUA N° 5.624.821 revela que, por alteração de qualquer dos resíduos 318 (Glu), 320 (Lys) e 322 (Lys) para Ala, não é possível abolir a ligação a Clq. Destaca que não é necessário substituir os resíduos iónicos apenas com Ala para abolir a ligação a Clq, mas que é também possível usar outros resíduos não iónicos substituídos com alquilo, tais

como Gly, Ile, Leu ou Val, ou tais como resíduos não polares aromáticos como Phe, Tyr, Trp e Pro, no lugar de qualquer dos três resíduos, para abolir a ligação a Clq. É também possível usar esses resíduos polares não iónicos como Ser, Thr, Cys e Met no lugar de resíduos 320 e 322, mas não 318, de forma a abolir a actividade de ligação a Clq. A Patente EUA Nº 5.624.821 também revela que a substituição do resíduo 297 (Asn) por Ala resulta em remoção da actividade lítica, enquanto reduz apenas ligeiramente (aproximadamente três vezes mais fraca) a afinidade para com Clq. Explica que se pensa que isto surge porque a alteração destrói o sítio de glicosilação e que a presença de hidratos de carbono é necessária para a activação do complemento. Destaca que qualquer outra substituição neste local vai também destruir o sítio de glicosilação. A Patente EUA Nº 5.624.821 revela também que mutações em locais adjacentes ou próximos da região de ligação da articulação (por exemplo, substituindo os resíduos 234, 236 ou 237 por Ala) indicam que alterações em resíduos 234, 235, 236 e 237 afectam, pelo menos, a afinidade para o receptor Fc gama R1.

Claro que se podem incorporar uma ou mais alterações de aminoácidos (tipicamente, as alterações de aminoácidos conservativas) que não afectem substancialmente as propriedades biológicas. Por conseguinte, as mutações possíveis não se restringem às discutidas acima. Anticorpos de qualquer natureza podem ser fornecidos em forma monoclonal (i.e. em combinação com anticorpos idênticos). Os hibridomas capazes de produzir anticorpos monoclonais da presente invenção estão também no âmbito da presente invenção.

Derivados de anticorpos

O termo “derivados de anticorpos” pretende permitir uma larga gama de alterações estruturais que podem ser feitas relativamente a um anticorpo, desde que se mantenham as propriedades funcionais desejadas.

Assim, por exemplo, a afinidade de ligação a TrkA é desejavelmente mantida.

Preferencialmente, os derivados são também eficazes num ou mais dos ensaios funcionais aqui descritos.

Para evitar dúvidas, note-se que se consideram todos os seguintes derivados como um derivado de um anticorpo da presente invenção:

- a) um fragmento do referido anticorpo;
- b) um multímero compreendendo uma pluralidade de fragmentos do referido anticorpo (aqui referido como um “multímero de fragmentos”);
- c) um produto de fusão do referido anticorpo, fragmento ou multímero de fragmentos com outra fracção;
- d) uma variante do referido anticorpo, fragmento, multímero de fragmentos ou produto de fusão tendo pelo menos 75% de identidade de sequência entre si.

Assim, o termo “derivado” é interpretado de forma ampla.

Passando agora aos fragmentos da presente invenção, eles têm, de preferência, pelo menos sete aminoácidos de comprimento (Assim, são pelo menos tão longos como a região CDR mais curta mostrada nas Figuras 1a e 1b para as cadeias pesadas e leves da presente invenção). Com maior

preferência, são pelo menos de dez, de pelo menos quinze ou de pelo menos vinte aminoácidos de comprimento.

Podem ser produzidos através de digestão proteolítica, partindo de anticorpos intactos, ou através de inserção de codões *stop* nas posições desejadas dos vectores que transportam as sequências codificadoras de ADN para as regiões variáveis da cadeia pesada e leve. Isto pode ser feito depois da região CH₁ produzir fragmentos Fab ou depois da região de articulação produzir fragmentos (Fab')₂.

Podem obter-se derivados sob a forma de cadeias ScFv por junção de regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve através de um ligante (Huston et al., PNAS, 85, 5879 (1988); Bird et al., Science, 242, 423 (1988)). Fragmentos Fv ou Fab podem ser expressos em *E. coli* (Buchner e Rudolph, Bio/Technology, 9, 157 (1991); Skerra et al., Bio/Technology, 9, 273 (1991)) ou ainda em células eucariotas, preferivelmente derivadas de mamíferos.

De facto, é possível uma grande variedade de formas de fragmentos, incluindo as discutidas por Holliger & Hudson em Nature Biotechnology, Vol 23, No 9, 1126-1136 (2005).

Estas formas estão todas no âmbito da presente invenção. Podem incluir fragmentos consistindo em cadeias VH ou VL individuais (por vezes conhecidas como "anticorpos de domínio" ou "dAbs") ou até fragmentos das referidas cadeias (por exemplo, regiões CDR individuais). Formas multiméricas estão também incluídas, tais como minicorpos, ScFv bis (ou superior), diacorpos, triacorpos, tetracorpos, multímeros Fab, etc. (aqui referidos como "multímero de fragmentos").

Além disso, várias outras fracções podem ser ligadas de forma covalente a anticorpos/fragmentos da presente invenção, de modo a proporcionar propriedades benéficas. Esses "produtos de fusão" estão incluídos nos derivados da presente invenção. A fracção pode, por exemplo, ser um agente de diagnóstico, um agente terapêutico, um agente de marcação, um agente que aumenta a semi-vida do produto ou um agente que reduz a imunogenicidade (preferencialmente num hospedeiro humano).

Por exemplo, podem proporcionar-se produtos de fusão sob a forma de anticorpos/fragmentos PEGuilados. O PEG tem sido predominantemente usado para reduzir a imunogenicidade e aumentar as semi-vidas de circulação de anticorpos. Pode também ter um efeito benéfico no uso de anticorpos em determinadas situações clínicas, tais como as que incidem em tumores.

As partes de um produto de fusão podem ser quimicamente ligadas umas às outras. Por exemplo, isto pode ser feito por reticulação utilizando agentes heterobifuncionais (por exemplo, carbodi-imida, glutaraldeído, etc.).

No caso das proteínas de fusão, estas são preferencialmente produzidas utilizando técnicas de engenharia genética. Assim, podem proporcionar-se sequências codificadoras apropriadas, baseadas no código genético, codificando a proteína de fusão desejada que pode, posteriormente, ser clonada na célula hospedeira usando um vector de expressão adequado. A expressão pode estar sob controlo de um promotor constitutivo ou induzível. A proteína de fusão expressada pode ser purificada utilizando técnicas padrão (por exemplo, pela utilização de procedimentos de

imunoafinidade). Podem usar-se sistemas de expressão à base de células ou sem células.

Proteínas de fusão podem, por exemplo, compreender anticorpos/fragmentos da presente invenção ligados a citotoxinas. Podem usar-se posteriormente as proteínas de fusão resultantes para marcar células que expressam receptores TrkA, por exemplo, células tumorais que expressam TrkA.

A produção de várias imunotoxinas citotóxicas é citada por Thorpe et al., *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, 168 (1982). De facto, um grande número de agentes citotóxicos adequa-se ao uso em imunotoxinas. Estes agentes incluem radionuclídeos, tais como iodo 131 ou outros isótopos de iodo, ítrio 90, rénio 188 e bismuto 212 ou outros isótopos que emitem partículas alfa, um grande número de fármacos quimioterapêuticos, como vindesina, metotrexato, adriamicina e cisplatina; proteínas citotóxicas, tais como proteínas que inibem ribossomas (por exemplo, proteína antiviral de erva-dos-cancros, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina da difteria, ricina A e clavina de origem vegetal), ou agentes activos a nível da superfície celular (por exemplo, enzimas de fosfolipase como a fosfolipase C).

Por vezes, a região citotóxica da imunotoxina pode ser imunogénica e, consequentemente, limitar a utilidade clínica da proteína de fusão no caso de terapia crónica ou de longa duração.

Uma alternativa para evitar o problema da imunogenicidade, é expressar, em fusão com o domínio de ligação do anticorpo/derivado, uma proteína capaz de interagir com o

ADN e ligar a esta proteína de fusão o vector (por exemplo, plasmídeo) que contém a cassette de expressão da toxina. As numerosas cargas positivas da protamina, uma proteína humana que se liga ao ADN, podem interagir de forma estável com as cargas negativas do ADN, gerando um parceiro de fusão para o anticorpo/derivado de carga neutra. Isto é muito mais estável e menos imunogénico que a própria toxina. Após incorporação do complexo anticorpo-vector através de endocitose mediada pelo receptor, a expressão da toxina provoca a morte da célula.

Além disso, se desejado, podem proporcionar-se promotores induzíveis ou específicos de célula na cassette de expressão da toxina. Esta abordagem tem o objectivo de maximizar a eliminação selectiva de células tumorais, enquanto minimiza os efeitos secundários da toxicidade (Chen et al., Gene Ther., 2, 116 (1995)).

As proteínas de fusão podem também incluir fusões com outros anticorpos/derivados. Por exemplo, têm-se usado fusões de dAbs para抗igénios específicos com outros dAbs capazes de ligar proteínas de soro de longa duração (por exemplo, albumina de soro) para aumentar a semi-vida do soro.

Sequências das cadeias pesadas e leves variáveis podem fazer parte de anticorpos multivalentes com especificidade para um ou mais抗igénios, um dos quais é TrkA, ou um ou mais epítopos dentro de TrkA.

Anticorpos multivalentes com especificidade para um ou mais抗igénios, um dos quais consiste em **Sistemas de expressão** de TrkA.

Podem utilizar-se muitos sistemas de expressão para providenciar anticorpos/derivados da presente invenção.

Por exemplo, podem utilizar-se sistemas procariotas que estão bem caracterizados.

E. coli é um dos hospedeiros procariotas que é particularmente útil para clonar sequências de ADN da presente invenção. Além disso, está disponível um grande número de promotores bem caracterizados, por exemplo a partir do operão *lac* ou *trp* ou β -lactamase ou fago λ . Tipicamente, estes promotores controlam a expressão e transportam locais de ligação para o ribossoma, para o correcto início e fim da transcrição e da tradução. É possível aumentar a semi-vida das imunoglobulinas da invenção, produzidas em sistemas procariotas, por conjugação com polietilenoglicol (PEG).

Podem usar-se outros organismos unicelulares, tais como leveduras, para a expressão. O hospedeiro de eleição é *Saccharomyces*, utilizando veículos apropriados munidos com sequências de controlo de expressão, de terminação e de origem da replicação.

Bibliotecas que apresentam fagos portadores de sequências das regiões variáveis das imunoglobulinas têm sido bem documentadas e podem ser utilizadas em estudos de ligação [Cesareni, FEBS Letts, 307, 66 (1992); Swimmer et al., PNAS, 89, 3756 (1992); Gram et al., PNAS, 89, 3576 (1992); Clackson et al., Nature, 352, 624 (1991); Scott & Smith, Science, 249, 386 (1990); Garrard et al., Bio/Techniques, 9, 1373 (1991)].

Também se podem usar culturas de células de insectos, particularmente utilizando células de *Drosophila* S2 transfectadas de forma estável ou células de *Spodoptera frugiperda* com o sistema de expressão à base do Baculovirus (Putlitz et al., Bio/Technology, 8, 651 (1990)).

Podem mesmo ser usadas plantas e culturas de células vegetais (Larrick & Fry, Hum. Antibodies Hybridomas, 2, 172 (1991); Benvenuto et al., Plant Mol. Biol., 17 865 (1991); Durin et al., Plant Mol. Biol.; 15,281 (1990); Hiatt et al., Nature, 342,76 (1989)).

É também possível a utilização de culturas de tecidos de células de mamífero para expressar os polipéptidos da presente invenção. Isto pode ser vantajoso na obtenção de padrões de glicosilação humanos. Podem ser expressados diferentes isotipos. O IgG1 tem provado ser o isotipo mais eficaz na indução da resposta imunitária (Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, NI, (1987)), enquanto o IgG4 é frequentemente utilizado para aplicações de diagnóstico (Riechmann et al., Nature, 332,323 (1988)).

Formas mutadas abolindo/reduzindo a activação do complemento, podem também ser providenciadas, tal como discutido anteriormente com referência às Patentes USA N°s 6.194.551, 5.624.821 e/ou 6.491.916.

Em particular, são preferidas células de mamíferos. Tem sido desenvolvido um grande número de linhagens celulares hospedeiras para a secreção de imunoglobulinas intactas, entre elas estão linhagens celulares CHO, várias linhagens celulares COS, as células HeLa, linhagens celulares de mieloma (NSO, SP/2, YB/0 e P3X63.Ag8.653), células B transformadas ou hibridomas. Vectores de expressão para

estas células podem incluir sequências de controlo de expressão, tais como uma origem de replicação, um promotor, um potenciador (Queen et al., PNAS, 86:10029 (1989)), as sequências requeridas para a ligação ao ribossoma, *splicing* de ARN e poliadenilação e sequências para a terminação da transcrição. As sequências de controlo de expressão de eleição são promotores derivados de genes de imunoglobulina e de vírus, tais como SV40, Adenovírus, Vírus do Papiloma Bovino, Citomegalovírus e semelhantes. Geralmente, o vector de expressão inclui um marcador de selecção, tal como a resistência à neomicina.

Para a expressão de anticorpos humanizados, é preferível cultivar linhagens celulares de mamíferos com um meio sem soro, por exemplo, a linhagem celular HUDREG-55 pode facilmente ser cultivada num meio de hibridoma sem soro e sem proteínas Cat. N° S-2897 de Sigma (St. Louis, Mo.).

Ácidos Nucleicos, Vectores, animais transgénicos

Sequências de ácidos nucleicos que codificam os anticorpos/derivados/cadeias de anticorpos da presente invenção podem ser produzidas por técnicas padrão, uma vez que as sequências de aminoácidos para as regiões variáveis fundamentais são aqui fornecidas e que as sequências de codificação correspondentes podem ser fornecidas usando o código genético. Estas sequências podem ser incorporadas em vectores de expressão e/ou clonadas em células.

Com efeito, as técnicas para a produção e clonagem de "anticorpos remodelados" com regiões CDR de roedores e regiões estruturais humanizadas são agora bem conhecidas. São discutidas, por exemplo, em Jones, Dear, Foote, Neuberger e Winter, Nature, 321, 522-4 (1986); em

Riechmann, Clark, Waldman e Winter, *Nature*, 332, 323-327 (1988) e em Verhoeven, Milstein e Winter, *Science*, 239, 1534-1536 (1988).

Esses ácidos nucleicos podem ser incorporados em vectores de expressão, incluindo plasmídeos, fagos, etc., como é bem conhecido na técnica e é discutido acima.

Os ácidos nucleicos da presente invenção podem também ser usados para conceber sondas ou iniciadores. Estes podem ser utilizados, por exemplo, para isolar ou amplificar ácidos nucleicos da presente invenção.

Portanto, as sondas e os iniciadores estão no âmbito da presente invenção. Tipicamente, são de pelo menos 10, de pelo menos 15 ou de pelo menos 20 bases de comprimento. Preferencialmente, hibridizam sob condições rigorosas com as cadeias de ácidos nucleicos que codificam anticorpos/derivados do presente invento ou as suas cadeias complementares. Um exemplo das condições rigorosas de hibridização envolve o uso de uma solução de pré-lavagem de 5 X SSC, SDS a 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) e a tentativa de hibridização durante a noite a 55°C utilizando 5 X SSC. Contudo, existem muitas outras possibilidades. Algumas destas estão enumeradas na Tabela 1 de WO98/45435, por exemplo (Ver especialmente as condições estabelecidas em A-F dessa tabela e, com menos preferência, as enumeradas em G a L ou M a R).

Num outro aspecto da presente invenção, os ácidos nucleicos podem ser vantajosamente utilizados para providenciar transgenes para o uso na produção de animais transgénicos não humanos, preferencialmente ratos. Aqui o

anticorpo/derivado pode ser expressado de forma induzível ou sob o controlo de promotores constitutivos.

Esses animais podem ser vantajosamente utilizados para estudar e testar fármacos para patologias humanas onde a interacção NGF/TrkA é inibida e, particularmente, patologias neurodegenerativas. Os anticorpos/derivados podem ser vantajosamente expressados num fluido corporal recuperável, tal como leite ou soro, a partir do qual podem ser recuperados e purificados utilizando técnicas normalizadas.

Os trangenes usados para produzir animais transgénicos podem compreender a(s) sequência(s) codificadora(s) relevante(s) operacionalmente ligada(s) a um promotor, normalmente em combinação com uma sequência activadora, tal como a da imunoglobulina de roedor ou o promotor/activador do gene da caseína (Buhler et al., Bio/Technology; 8, 140 (1990); Meade et al., Bio/Technology, 8, 443 (1990)).

Os trangenes podem ser transferidos para células ou embriões através de recombinação homóloga. Pode produzir-se uma grande variedade de animais transgénicos não humanos, incluindo ratos, ratazzanas, ovelhas, vacas, cabras, etc. (ver WO 91/08216).

Será entendido, a partir da descrição anterior, que a presente invenção proporciona uma variedade de novos anticorpos, derivados, ácidos nucleicos, etc.

Se desejado, estes podem ser providenciados numa forma substancialmente purificada. Para o propósito da presente invenção, isto significa que representam a maioria do peso seco de uma composição específica. Podem, por exemplo,

representar pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 98% do referido peso seco

Podem ser providenciados numa forma isolada. Isto significa que são removidos de um ou mais de outros componentes com os quais podem estar normalmente associados na natureza (por exemplo, um ácido nucleico pode ser providenciado numa forma em que está isolado de uma célula).

Podem ser providenciados numa variedade de outras formas. Por exemplo, podem ser unidos a fracções heterólogas e/ou podem ser imobilizadas.

Todas as formas acima estão no âmbito da presente invenção.

A presente invenção vai ser descrita a título meramente ilustrativo, com referência aos esquemas em anexo, onde:

As Figura 1a & 1b mostram alinhamentos de sequências de aminoácidos para várias cadeias pesadas e leves.

A Figura 2 mostra os resultados para a especificidade de ligação a抗ígeno para TrkA-IgG, em relação aos sobrenadantes dos vários clones resultantes de uma experiência que envolve a expressão transitória das variantes MNAC13 humanizadas em células COS-7.

A Figura 3 mostra os resultados de uma experiência na qual a ligação celular dos anticorpos a TrkA, expresso em células TF-1, foi analisada por análise de citometria de fluxo.

A Figura 4 mostra os resultados de uma análise adicional em que os melhores ligantes identificados a partir da Figura 3 (BXhVH3VL3, BXhVH5VL1, BXhVH5VL3 e HuMNACWOv) foram comparados com HuMNACWO.

A Figura 5 mostra os resultados de um ensaio em que os diferentes candidatos humanizados foram testados em paralelo com o anticorpo de murino MNAC13 (muMNACEP), chimMNAC 13, HuMNACWO e IgG1 humana como controlo padrão.

A Figura 6 mostra as cadeias pesadas e leves para BXhVH5VL1, incluindo as regiões constantes (o primeiro aminoácido da região constante está sublinhado).

A Figura 7 mostra a cadeia pesada para BXhVH5VL1 N297A, incluindo a região constante (o primeiro aminoácido da região constante está sublinhado e a posição 297A está a negrito e sublinhada).

A Figura 8 mostra BXhVH5VL1 e BXhVH5VL1 N297A ligados a linhagens celulares que expressam huTrkA.

A Figura 9 mostra o efeito de vários anticorpos na produção de MIP-1 β induzida por NGF em linhagens celulares de mastócitos humanos HMC-1.

A Figura 10 mostra a ligação de BXhVH5VL1 a receptores Fc ligados a células na linhagem celular THP1, em comparação com BXhVH5VL1 N297A.

A Figura 11 mostra uma experiência que demonstra o efeito analgésico da injecção intradérmica local de BXhVH5VL1 N297A ou hIgG de controlo, quando co-injectado com rhNGF.

A Figura 12 mostra uma experiência que demonstra o efeito analgésico da injecção intradérmica local de muMNACEP ou mIgG de controlo, quando co-injectado com rhNGF.

A Figura 13 mostra uma experiência que demonstra o efeito analgésico da administração sistémica de BXhVH5VL1 N297A, quando comparado com o hIgG de controlo, num modelo animal de dor induzida por NGF.

A Figura 14 mostra uma experiência que demonstra o efeito analgésico da administração sistémica de

muMNACEP, quando comparado com o hIgG de controlo, num modelo animal de dor induzida por NGF.

Exemplos

Antes de discutir os exemplos em detalhe, apresenta-se em baixo alguma da nomenclatura aqui utilizada:

muMNACEP

Este termo é usado para indicar o anticorpo de murino MNAC13, tal como descrito em EP1181318. A região variável da cadeia pesada deste anticorpo é aqui referida como mVHEP (SEQ ID NO. 15). A região variável da cadeia leve é aqui referida como mVLEP (SEQ ID NO. 16).

HuMNACWO

Este termo é usado para indicar o anticorpo humanizado MNAC13, descrito em WO 05/061540.

A região variável da cadeia pesada deste anticorpo é aqui referida como HuVHWO (SEQ ID NO. 17). A região variável da cadeia leve é aqui referida como HuVLWO (SEQ ID NO. 18).

HuMNACWOv

Este termo é usado para indicar uma variante do anticorpo revelado em HuMNACWO (ver acima), no qual a região CDR3 da cadeia pesada foi substituída pela região CDR3 correspondente, presente em muMNACEP. A variante é nova e está no âmbito da presente invenção.

A região variável da cadeia pesada deste anticorpo é aqui referida como HuVHW_Ov (SEQ ID NO. 6). A região variável da cadeia leve pode ser aqui referida como HuVLW_Ov. Contudo, para evitar duplicação, não é mostrada na Figura 1b porque é a mesma que HuVLW_O (SEQ ID NO. 18).

ChimMNAC13

Este corresponde a muMNACEP, mas possui regiões constantes humanas, em vez de regiões constantes de rato. A região variável da cadeia pesada deste anticorpo é aqui referida como mVHEP (SEQ ID NO. 15). A região variável da cadeia leve é aqui referida como mVLEP (SEQ ID NO. 16), 3-23*01 (SEQ ID NO. 19), JH4 (SEQ ID NO. 20), L6*01 (SEQ ID NO. 21) e JK1 (SEQ ID NO. 22).

Estas são sequências de codificação derivadas de genes da linhagem germinal humana.

São usadas para avaliar o grau de humanização na Tabela 1. Assim, se não houver nenhuma alteração em relação a uma sequência da linhagem germinal humana, considera-se que existe 100% de humanização.

$$[\text{A percentagem de humanização} = \frac{\text{número de alterações}}{100} \times \frac{\text{nº total de resíduos comparados}}{\text{comparados}}]$$

A tabela abaixo mostra a percentagem de humanização para as diferentes variantes:

Tabela 1

Variante de sequência	Número de AA murino na FW/ número de AA total na FW	% de humanização (relativa à sequência FW)	Número de AA murino incluindo AA de CDR /número de AA total na região variável	% de humanização (relativa à sequência variável completa)
BXhVH1	0/87	100	36/123	70,7
BXhVH2	3/87	96,6	39/123	68,3
BXhVH3	3/87	96,6	39/123	68,3
(continuação)				
Variante de sequência	Número de AA murino na FW/ número de AA total no FW	% de humanização (relativa à sequência FW)	Número de AA murino incluindo AA de CDR /número de AA total na região variável	% de humanização (relativa à sequência variável completa)
BXhVH4	3/87	96,6	39/123	68,3
BXhVH5	5/87	94,2	41/123	66,7
BXhVHWO	12/87	86,2	48/123	61,0
BXhVL1	0/80	100	26/106	75,5
BXhVL2	4/80	95	30/106	71,7
BXhVL3	6/80	92,5	32/106	69,8
BXhVL4	6/80	92,5	32/106	69,8
BXhVL5	6/80	92,5	32/106	69,8
BXhVL6	8/80	90	34/106	67,9
BXhVL7	8/80	90	34/106	67,9
BXhVL8	11/80	86,2	37/106	65,1
BXhVLWO	9/80	88,8	35/106	67

Pode observar-se que todas as variantes de cadeias variáveis têm um grau de humanização em relação às regiões estruturais de mais de 85%.

Sequências "BX"

As sequências identificadas com um código começando com "BX" são sequências novas da presente invenção. As letras que se seguem a "BX" são VH ou VL, para indicar uma cadeia

variável pesada ou leve, respectivamente. As sequências são então simplesmente numeradas consecutivamente pela ordem em que são apresentadas nas Figuras 1a e 1b para uma dada cadeia.

Existem cinco sequências de cadeia pesada. Portanto, são numeradas:

BXhVH1 (SEQ ID NO. 1)
BXhVH2 (SEQ ID NO. 2)
BXhVH3 (SEQ ID NO. 3)
BXhVH4 (SEQ ID NO. 4)
BXhVH5 (SEQ ID NO. 5)

Há oito sequências de cadeia leve. Portanto, são numeradas:

BXhVL1 (SEQ ID NO. 7)
BXhVL2 (SEQ ID NO. 8)
BXhVL3 (SEQ ID NO. 9)
BXhVL4 (SEQ ID NO. 10)
BXhVL5 (SEQ ID NO. 11)
BXhVL6 (SEQ ID NO. 12)
BXhVL7 (SEQ ID NO. 13)
BXhVL8 (SEQ ID NO. 14)

As cadeias podem ser combinadas em anticorpos ou seus derivados.

As quarenta combinações possíveis foram todas produzidas e são:

BXhVH1VL1, BXhVH1VL2, BXhVH1VL3, BXhVH1VL4, BXhVH1VL5,
BXhVH1VL6, BXhVH1VL7, BXhVH1VL8, BXhVH2VL1, BXhVH2VL2,
BXhVH2VL3, BXhVH2VL4, BXhVH2VL5, BXhVH2VL6, BXhVH2VL7,

BXhVH2VL8, BXhVH3VL1, BXhVH3VL2, BXhVH3VL3, BXhVH3VL4,
BXhVH3VL5, BXhVH3VL6, BXhVH3VL7, BXhVH3VL8, BXhVH4VL1,
BXhVH4VL2, BXhVH4VL3, BXhVH4VL4, BXhVH4VL5, BXhVH4VL6,
BXhVH4VL7, BXhVH4VL8, BXhVH5VL1, BXhVH5VL2, BXhVH5VL3,
BXhVH5VL4, BXhVH5VL5, BXhVH5VL6, BXhVH5VL7, BXhVH5VL8.

"N297A"

A designação "N297A" depois de um nome de um anticorpo indica que a posição 297 da região constante da cadeia pesada está mutada de N para A. A sequência BXhVH5VL1 N297A é providenciada como SEQ ID No. 23.

Vectores de expressão

As sequências codificadoras apropriadas foram ligadas a uma sequência que codifica para um sinal secretor 5' e uma sequência de junção de dador 3' com o ADNc para clonagem num sistema de expressão de anticorpos. Os fragmentos de ADN foram clonados em vectores de expressão IgG1. Estes vectores de expressão foram baseados em sequências genómicas codificando os domínios constantes humanos e as cassetes de clonagem para a inserção de fragmentos de ADNc seleccionados das sequências hVH e hVL.

Expressão transitória das variantes humanizadas MNAC13 em células COS-7 e determinação dos títulos em anticorpos

Cada combinação de cadeia pesada e leve foi transfetada transitoriamente em células COS-7 e foi determinado o título em anticorpos.

Os vectores de expressão que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada foram co-transfetados transitoriamente em células COS-7 por lipofecção usando Lipofectamina, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Germany), num formato de 24 cavidades. Após a transfecção, o meio foi substituído por DMEM contendo 10% de FCS e 2% de L-glutamina e os sobrenadantes das células COS-7 foram recolhidos 4 dias após a transfecção. O título em anticorpos dos anticorpos humanizados segregados para o sobrenadante de células COS-7 transfetadas foi analisado por um teste ELISA de tipo sanduíche. Resumidamente, uma cadeia kapa anti-humana de rato que reconhece o antícorpo (BD) foi imobilizada numa placa de 96 cavidades, bloqueada e incubada com o sobrenadante diluído de células COS-7 transfetadas. A presença de anticorpos foi detectada por um antícorpo IgG (H + L) anti-humano de coelho conjugado com POD. Um antícorpo químérico de controlo foi usado como padrão em concentrações de 1 a 10 ng/ml. As concentrações de antícorpo determinadas foram posteriormente ajustadas por uma amostra de padrão interno tendo uma concentração de antícorpo normalizada.

Exemplo 1

Comparação da ligação do antícorpo humanizado com respeito a TrkA-IgG em ELISA

Com base na concentração de antícorpo determinada, os sobrenadantes de todas as amostras foram ajustados para a mesma concentração de antícorpo.

As actividades de ligação de todas as variantes de anticorpos humanizados foram analisadas através de ELISA

para detecção de antigénio de TrkA-IgG. Foram comparadas com as actividades de ligação de ChimMNAC13 e HuMNACWov.

Os anticorpos e antigénios foram descongelados, retiraram-se aliquotas e armazenaram-se a - 20°C. Aliquotas dos anticorpos em utilização foram armazenadas a 4°C durante um período máximo de duas semanas.

O ELISA para detecção de antigénio foi realizado como se segue: revestiram-se placas Maxisorb (Nunc, Alemanha) com 0,125, 0,25, 0,5 e 1 µg/ml de TrkA-IgG. Para verificar a especificidade da ligação anticorpo-antigénio, foi utilizado TrkB-IgG (1 µg/ml) como um controlo negativo.

Variantes de anticorpos expressos transitoriamente foram usadas a 1, 10 e 100 ng / ml.

O procedimento detalhado foi o seguinte:

Revestimento

Placas: Nunc MaxiSorp 96 cavidades.

De 100 µl/cavidade de TrkA-IgG a 2 µg/ml em Tampão Carbonato 0,1M, pH 9,6 (TrkA-IgG usado como controlo negativo).

Selar placa e incubar durante a noite a +4°C.

Lavar 3 vezes com 200 ml de tampão de lavagem.

Bloqueamento

Bloquear placas através da adição de 200 µl de Tampão de Saturação SuperBlock em PBS (Pierce Prod # 37515) em cada cavidade.

Esvaziar imediatamente a placa por inversão.

Repetir mais duas vezes.

Incubar a 37°C por duas horas.

Anticorpo Primário

Descartar o sobrenadante e adicionar 100 µl de mAb purificado diluído apropriadamente em Tampão TEST.

(intervalo da curva padrão: 50-5000 pg/ml)

Selar placa e incubar a 37°C por 2 horas.

(De modo a aumentar a sensibilidade, incubar durante a noite a +4°C)

Lavar 4 vezes com tampão de lavagem.

Anticorpo Secundário

Adicionar 100 µl de IgG de cabra anti-rato conjugado com HRP (Pierce cat. 31430) diluído 1:10000 em Tampão TEST.

Incubar a 37°C por duas horas.

Lavar 4 vezes com tampão de lavagem.

Desenvolvimento

Adicionar 100 µl de solução de substrato a cada cavidade

Incubar à temperatura ambiente.

Parar a reacção com 100 µl de H₂SO₄ 2M.

Determinar a densidade óptica de cada cavidade usando um leitor de microtitulação a 450 nm.

Resultados

Os resultados para os sobrenadantes dos vários clones avaliados em relação à especificidade de ligação ao抗ígeno, usando o teste de ELISA, são apresentados na Figura 2.

Resumidamente, o antigénio específico TrkA-IgG (barras negras) e o controlo negativo TrkA-IgG (barras brancas) foram revestidos numa concentração de 1 µg/ml em diferentes placas de 96 cavidades.

Os sobrenadantes de anticorpos foram quantificados, diluídos de forma adequada e testados numa concentração de 5 ng/ml. Depois da lavagem, detectou-se ligação com o anticorpo secundário marcado com HRP apropriado, revelada por uma reacção cromogénica e quantificada por medição da DO a 450/630 nm.

A maioria dos anticorpos humanizados apresenta uma afinidade selectiva comparável para altas densidades de antigénio TrkA.

Além disso, a sua especificidade de ligação não é significativamente diferente do anticorpo TrkA parental de murino anti-humano e da sua isoforma químérica, o que indica que a selectividade do antigénio foi totalmente preservada ao longo do processo de humanização.

Exemplo 2

Ensaio de ligação celular de novos candidatos por análise de citometria de fluxo da expressão de TrkA na superfície de células TF-1

Procedimento

Colher células da cultura, preparar uma suspensão de uma única célula.

(De modo a obter expressão de抗igénio máxima, dividir as células 1:3 no dia anterior).

Distribuir $0,3-0,4 \times 10^6$ células/amostra e lavar uma vez com tampão FACS frio (PBS pH 7,4 + 0,1% NaN₃ + 0,1% BSA).

Centrifugar a 350 x g por 5 min.

Descartar sobrenadante e manter os tubos em gelo.

Bloqueamento de Receptores Fc

Adicionar 50 µl/amostra de IgG Humana [300 µg/ml] em tampão FACS e misturar em vórtice suave.

Incubar a 4°C durante 15 min.

Anticorpo Primário

Adicionar 100 µl/amostra de Anticorpo Primário muMNAC13 [4 µg/ml] em tampão FACS e misturar em vórtice suave.

Como controlo negativo, usar isotipo IgG1 de rato purificado, à mesma concentração. Incubar a 4°C durante 30 min.

Lavar duas vezes com 1 ml de tampão FACS, centrifugar 5 min a 350 x g e descartar o sobrenadante.

Anticorpo Secundário

Adicionar 100 µl/amostra de IgG de burro anti-rato (H+L) conjugada com R-Ficoeritrina

Jackson ImmunoResearch cat.# 715-116-151 em tampão FACS e misturar em vórtice suave.

Incubar a 4°C durante 30 min.

Lavar 2X com 1 ml de tampão de FACS, centrifugar 5 min a 350 x g e descartar o sobrenadante. Voltar a suspender em 0,5 ml de tampão FACS.

Adquirir dados da amostra num citómetro de fluxo.

Resultados

As células TF-1 foram coradas com sobrenadantes de todos os clones, bem como os anticorpos HuMNACWO e HuMNACWOv como controlos (4 µg/ml) durante 30 min. a 4°C.

A coloração foi revelada por um anticorpo secundário apropriado, marcado com PE, e quantificada por análise de citometria de fluxo para avaliar a intensidade de fluorescência da ligação.

Os resultados são mostrados na Figura 3 que se baseia na tabela abaixo.

Tabela 2

Nº	Variantes	Fluorescência Geo Mean				Nº de vezes de aumento		
		Média	±	D.P.		Média	±	D.P.
1	mVHEP/mVLEP	11,0	±	2,2		3,2	±	0,7
2	hVHWOv/hVLWO	8,9	±	1,9		2,6	±	0,6
3	hVH1/hVL1	5,7	±	0,4		1,7	±	0,1
4	hVH1/hVL2	4,6	±	0,4		1,3	±	0,1
5	hVH1/hVL3	6,1	±	0,6		1,8	±	0,2
6	hVH1/hVL4	5,1	±	0,5		1,5	±	0,2
7	hVH1/hVL5	4,5	±	0,3		1,3	±	0,1
8	hVH1/hVL6	4,9	±	0,4		1,4	±	0,1
9	hVH1/hVL7	5,1	±	0,4		1,5	±	0,1
10	hVH1/hVL8	5,2	±	0,1		1,5	±	0,0
11	hVH2/hVL1	9,2	±	1,3		2,6	±	0,4
12	hVH2/hVL2	6,4	±	0,7		1,8	±	0,2
13	hVH2/hVL3	10,8	±	1,3		3,1	±	0,4
14	hVH2/hVL4	6,1	±	0,3		1,8	±	0,1
15	hVH2/hVL5	6,4	±	0,2		1,8	±	0,1

16	hVH2/hVL6	6,4	±	0,7		1,8	±	0,2
17	hVH2/hVL7	6,5	±	0,8		1,9	±	0,3
18	hVH2/hVL8	6,5	±	1,0		1,9	±	0,3
19	hVH3/hVL1	8,6	±	1,5		2,5	±	0,5
20	hVH3/hVL2	7,1	±	2,1		2,0	±	0,6
21	hVH3/hVL3	12,6	±	0,6		3,6	±	0,2
22	hVH3/hVL4	7,1	±	0,1		2,0	±	0,0
23	hVH3/hVL5	6,9	±	0,5		2,0	±	0,2
24	hVH3/hVL6	6,4	±	0,5		1,8	±	0,2
25	hVH3/hVL7	7,1	±	1,0		2,0	±	0,3
26	hVH3/hVL8	6,5	±	1,2		1,9	±	0,3
27	hVH4/hVL1	10,4	±	2,4		3,0	±	0,7
28	hVH4/hVL2	8,3	±	2,5		2,4	±	0,7
29	hVH4/hVL3	10,9	±	3,0		3,1	±	0,9
30	hVH4/hVL4	8,0	±	2,2		2,3	±	0,6

(continuação)

Nº	Variantes	Fluorescência Geo Mean			Nº de vezes de aumento		
		Média	±	D.P.	Média	±	D.P.
31	hVH4/hVL5	8,6	±	1,7	2,5	±	0,5
32	hVH4/hVL6	8,0	±	1,4	2,3	±	0,4
33	hVH4/hVL7	8,7	±	2,5	2,5	±	0,7
34	hVH4/hVL8	8,3	±	1,9	2,4	±	0,6

Os resultados mostram que todos os clones testados, assim como HuMNACWOv, detectaram positivamente os receptores de TrkA associados à membrana em células TF1, embora em medidas diferentes. O HuMNACWO não é capaz de corar células TF1, que têm uma baixa densidades de receptores TrkA superficiais.

Para maior confirmação, a partir de 40 clones testados, seleccionaram-se os melhores ligantes para uma análise mais profunda.

Tal como avaliado em duas experiências separadas (Figura 4), BXHVH3VL3, BXhVH5VL1, BXhVH5VL3 e HuMNACWOv foram comparadas com HuMNACWO.

Os líderes seleccionados foram confirmados bons ligantes e com desempenho ligeiramente melhor quando comparados com HuMNACWOv.

As isoformas de anticorpos humanizados BXhVH5VL1 N297A e BXhVH5VL1, em conjunto com os anticorpos de referência muMNACEP e HuMNACWO, foram também testadas em relação à capacidade de ligação a linhagens celulares TF-1, HMC-1 e PC12-hTrkA, que expressam diferentes níveis de receptor hTrkA superficial.

Tal como se mostra na Figura 8, os anticorpos BXhVH5VL1 N297A e BXhVH5VL1, comparativamente, ligam todas as linhagens celulares testadas, independentemente da densidade de receptores na superfície celular. Ambos os anticorpos parecem ligar mais eficientemente quando comparados com muMNACEP parental. O HuMNACWO apenas liga a linhagem celular com alta densidade de receptores superficiais PC12-hTrkA.

Exemplo 3

Comparação da actividade biológica de anticorpos humanizados *in vitro* com um ensaio de proliferação em células TF1

Para medir a capacidade de anticorpos monoclonais TrkA anti-humanos para bloquear a actividade biológica na superfície da célula mediada por TrkA-β-NGF, usou-se um ensaio de proliferação celular utilizando uma linhagem

celular humana eritroleucémica dependente de factor, TF1 (Kitamura, T. et al., 1989, J. Cell Physiol. 140:323-334).

Incubaram-se células TF-1 com várias concentrações dos anticorpos durante 0,5 horas, a 37°C, numa placa de cultura plana de 96 cavidades.

Seguindo este período de pré-incubação, adicionou-se β -NGF (rec-hu- β -NGF, R&D Systems) humana recombinante à mistura célula-anticorpo.

A mistura de teste, num volume total de 200 μ l, contendo anticorpo a diferentes concentrações indicadas, β -NGF humana a 5,0 ng/mL e células TF-1 a 5×10^3 células/cavidade, foi incubada a 37°C, durante 5 dias, numa incubadora de CO₂ humidificado.

Depois desse período, as placas foram centrifugadas e, depois da remoção dos sobrenadantes, congeladas a -80°C para ocorrer a lise das células.

Foi usado o *Kit* de Teste de Proliferação Celular CyQUANT (Sondas Moleculares) para medir a proliferação das células de acordo com as instruções do fabricante.

Esta experiência foi realizada duas vezes.

Resultados

Foram testados diferentes candidatos humanizados em paralelo com o anticorpo MNAC13 de murino (muMNACEP), chimMNAC13, HuMNACWO e IgG1 Humano como controlos normalizados (Figura 5).

Calcularam-se os valores de CI50 para cada curva e os resultados são dados na tabela a seguir apresentada.

Verificou-se que o anticorpo BXhVH5VL1 teve o melhor desempenho de entre os candidatos.

As cadeias pesadas e leves para este anticorpo são assim apresentadas na Figura 6.

O CI50 médio para MNAC13 de murino, depois de uma série de experiências, foi de $0,54 \pm 0,47 \text{ }\mu\text{g/ml}$.

Tabela 3

Ensaio de proliferação em células TF1 CI50 ($\mu\text{g/ml}$)			
muMNACEP	Média		DP $0,47$
	EXP-1	EXP-2	
	0,06	0,58	
ChimMNAC13			
BXhVH5VL1	0,17	1,84	
BXhVH3VL3	0,41	2,38	
BXhVH5VL3	1,40	1,21	
HuMNACWO	-	-	
HuIgGstd	-	-	

Exemplo 4

Análise de ressonância plasmónica de superfície

A análise de ressonância plasmónica de superfície foi usada para medir as constantes do grau de associação e dissociação para as cinéticas de ligação de diferentes anticorpos (murino, químérico, 5 variantes humanizadas) em

relação a TrkA-IgG, utilizando BIACORE 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suécia). O TrkA-IgG foi immobilizado num chip sensor CM-5, de acordo com as condições do fabricante, de forma a atingir uma densidade de immobilização de 1100 RU. Cada amostra de anticorpo foi analisada a gamas de concentração de anticorpo de 20-0,63 µg/ml. Realizaram-se cálculos a partir das imagens dos sensores através do uso do software de avaliação BIA versão 3 (1999).

Analisaram-se conjuntos individuais de imagens dos sensores com o software de avaliação BIA versão 3 (1999). Entre os diferentes modelos testados para coincidirem com os dados cinéticos, obteve-se a melhor concordância com o algoritmo "separado 1:1". Neste modelo, apenas uma gama definida das curvas de associação e dissociação iniciais foi usada para o cálculo. É assumido que, durante estas fases iniciais da curva, os efeitos de sobreposição, como a transferência de massa, re-ligação ou outros não afectam os cálculos.

Resultados

A constante de dissociação (K_D) foi determinada para vários anticorpos e é apresentada na tabela seguinte, por ordem de valor crescente.

O valor de K_D tem unidades molares (M), que correspondem à concentração do ligando na qual um local de ligação de uma determinada proteína está meio ocupado. Quanto mais pequeno o valor, mais fortemente se liga o ligando ou maior é a afinidade entre o ligando e a proteína (neste caso, entre o antigénio e o anticorpo).

Tabela 4

Anticorpo	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D [M]
ChimMNAC13	2,68x10 ⁵	3,53x10 ⁻⁴	1,51x10 ⁻¹⁰
MNAC13	8,50x10 ⁵	1,67x10 ⁻⁴	2,50x10 ⁻¹⁰
BXhVH5VL1	7,68x10 ⁵	4,70x10 ⁻⁴	6,15x10 ⁻¹⁰
BXhVH5VL3	1,00x10 ⁶	6,38x10 ⁻⁴	6,62x10 ⁻¹⁰
BXhVH3VL3	3,25x10 ⁵	4,42x10 ⁻⁴	1,45x10 ⁻⁹
HuMNACWOv	1,62x10 ₆	3,86x10 ⁻³	2,48x10 ⁻⁹
HuMNACWO (experiência separada)	7,39x10 ₅	3,09x10 ⁻²	4,18x10 ⁻⁸

Pode ser visto, pela tabela acima, que as K_D calculadas para as isoformas de murino e químéricas são muito semelhantes.

São ligeiramente inferiores, mas da mesma ordem de grandeza que as variantes humanizadas BXhVH5VL1 e BXhVH5VL3.

Pelo contrário, as variantes humanizadas HuMNACWOv e BXhVH3VL3 apresentam uma K_D de uma maior ordem de grandeza que a observada para as variantes de murino e químéricas.

Contudo, estes valores de K_D ainda continuam inferiores aos do anticorpo humanizado HuMNACWO da técnica anterior.

De facto, valores de K_D preferidos para anticorpos/variantes da presente invenção, usando este modelo, estão abaixo de 4,18x10⁻⁸ (sendo assim, inferiores aos do anticorpo humanizado HuMNACWO da técnica anterior).

Com maior preferência, são inferiores a 2,48x10⁻⁹ (sendo assim, inferiores aos de HuMNACWOv, que é uma variante de

HuMNACWO com as mesmas regiões estruturais mas com alterações na terceira CDR da cadeia pesada).

Mais preferivelmente, os valores de K_D situam-se abaixo de 1×10^{-9} (sendo assim, da mesma ordem de grandeza geral que para as isoformas de murino e químéricas).

De forma consistente, a classificação dada na tabela acima, que se baseia nos dados calculados usando o algoritmo "separado", reflecte muito bem a classificação obtida por inspecção visual das imagens dos sensores de todas as variantes estudadas em parcelas de sobreposição.

Exemplo 5

Comparação da actividade biológica de anticorpos humanizados in vitro com um teste de secreção de quimiocinas na linhagem celular de mastócitos HMC-1

O NGF actua como um intermediário importante na dor inflamatória, contribuindo tanto para a sensibilização periférica como para a central. A sensibilização de nociceptores periféricos pode ser muito rápida e pode envolver células não neurais, tais como mastócitos.

Para medir a capacidade de anticorpos monoclonais TrkA anti-humanos para inibir a secreção de MIP1 α induzida por β -NGF, usou-se um ensaio biológico, utilizando a linhagem celular de mastócitos HMC-1 (Ahamed, J. et al., J Immunol. 2004 Jun 1;172(11):6961-8).

Colocaram-se células HMC-1 ($0,1 \times 10^6$ /cavidade) em placas, em triplicado, num meio de cultura completo, numa placa de cultura plana de 96 cavidades, e incubaram-se com várias

concentrações de anticorpo monoclonal, durante 0,5 horas a 37°C.

Depois deste período de pré-incubação, adicionou-se β -NGF recombinante humano (rec-hu- β -NGF, R&D Systems) à mistura célula-anticorpo até uma concentração final de 50 ng/ml e a incubação a 37°C prolongou-se por 6 horas numa incubadora de CO₂ humidificado.

Os sobrenadantes foram recolhidos e os níveis de MIP-1 β foram quantificados através de um ELISA de tipo sanduíche, utilizando um KIT ELISA DuoSet® para CCL4/MIP1- β Humano de R&D System (Cat. Nr.DY271).

Os dados obtidos foram expressos como percentagem de resposta e analisados com software GraphPad Prism 5, usando uma análise de regressão não linear, log(inibidor) vs. equação do declive variável-resposta normalizada.

Resultados

O anticorpo BXhVH5VL1 N297A foi avaliado em paralelo com muMNACEP de murino, HuMNACWO e IgG1 Humana como controlo normalizado. Calcularam-se os valores de CI50 para cada curva e os resultados são apresentados na Figura 9. A actividade inibidora de BXhVH5VL1 N297A foi significativamente maior que a do anticorpo humanizado HuMNACWO.

Exemplo 6

Caracterização *in vitro* de BXhVH5VL1 N297A e BXhVH5VL1.
Avaliação da ligação a FcRs celulares em células THP-1

A linhagem de células da leucemia monocítica aguda humana THP1 (ATCC) foi cultivada em RPMI1640/GLUTAMAX (Invitrogen) + 10% de Soro Bovino Fetal (Invitrogen) + Pen/Strep. e mantida entre 2-9x100.000 células/ml.

As células foram colhidas a partir da cultura e preparadas como uma suspensão de uma única célula. Distribuíram-se então $0,3-0,4 \times 10^6$ células/amostra em placas de cultura de tecidos de fundo redondo de 96 cavidades (Costar. Cambridge, MA) e lavaram-se 1X com tampão FACS frio.

Após centrifugação a 3,50 x g durante 5 min., o sobrenadante é descartado e as placas postas em gelo. Realizou-se a ligação de IgG a Fc_yRs em células THP-1 por incubação de IgGs monoméricas em Tampão FACS, partindo de 30 µg/ml até 0,02 µg/ml (diluições 1:3), num volume total de 100 µl, a 4°C, durante 30 min.

As células foram depois lavadas três vezes com 200 µl de tampão FACS e conseguiu-se detectar a ligação de IgG por adição de 100 µl de IgG (H+L) de burro anti-humano conjugada com R-Ficoeritrina (Jackson Immuno Research cat.# 709-116-149) 1:100 em tampão FACS. Após vórtice suave, as células foram incubadas a 4°C durante 30 min.

As placas foram lavadas 2X com 200 µl de tampão FACS, as células são finalmente suspensas de novo e transferidas para 0,5 ml de tampão FACS e obtidas por utilização de um citómetro de fluxo.

Resultados

A Figura 10 mostra claramente que, como esperado com base em publicações da técnica anterior (ver Patente USA

5.624.821 Winter), a isoforma mutada BXhVH5VL1 N297A é desprovida de capacidade significativa de ligação aos receptores celulares Fc.

Exemplo 7

Experiências in vivo

Descrevem-se a seguir experiências *in vivo* que foram realizadas para testar mais profundamente os anticorpos/derivados da presente invenção.

Modelos de dor mediada por NGF

O factor de crescimento neural (NGF) e o seu receptor TrkA são mediadores cruciais nas sensações de dor características da dor inflamatória.

Tipicamente, o NGF é conhecido como um factor de sobrevivência do desenvolvimento para os neurónios sensoriais e simpáticos, mas continua a ser sintetizado em animais adultos na periferia, onde é transportado de forma retrógrada para os corpos celulares dos neurónios sensoriais (Hendry et al., 1974, Otten et al., 1980).

A inflamação e a lesão do nervo causam a libertação de NGF que estimula fibras aferentes primárias e induz sensibilização comportamental. O tratamento subcutâneo crónico com NGF em ratazanas causa hiperalgésia e altera a sensação cutânea local (Lewin et al., 1993; Andreev et al., 1995).

Injecção intradérmica de rhNGF no antebraço de um humano e no músculo masseter em humanos, provoca hiperalgésia, alodínea e altera a sensação cutânea local que começa 3 horas após a injecção e atinge um pico 1-7 dias após a injecção e que recupera pelo dia 21 (Dyck et al., 1997; Svensson et al., 2003).

Assim, injecções de rhNGF na pata posterior de ratazana foram aqui utilizadas como um modelo de sensibilização comportamental que foi especificamente gerado por NGF.

As presentes experiências envolveram dois protocolos diferentes:

1. Primeiro, examinou-se se a injecção intradérmica de (rh) NGF recombinante humano sozinho, na pata de rato, poderia causar sensibilização comportamental como medido por testes nociceptivos padrão para a hiperalgésia (Teste plantar de Hargreave). Em seguida, verificou-se se a co-injecção intradérmica dos anticorpos IgG de murino, muMNACEP, IgG humana e BXhVH5VL1 N297A, numa dose de 100 µg, poderia afectar a sensibilização induzida por rhNGF. Os anticorpos Ig1 de murino e IgG humana foram usados como controlos negativos, em doses apropriadas.
2. Foi depois determinado se o tratamento sistémico de anticorpo muMNACEP (em doses de 8 e 1 mg/kg, i.p.) e BXhVH5VL1 N297A (doses de 8, 3 e 1 mg/kg, i.p.) poderia afectar a sensibilização periférica induzida por rhNGF.

No primeiro protocolo, onde os tratamentos foram administrados localmente, utilizaram-se ratazanas Lewis macho (Charles River, 5-6 semanas, 200g), com 8-9 animais por grupo e 4 grupos experimentais, injectados de acordo

com o método definido. Aplicaram-se as injecções de forma cega. Um resumo dos tratamentos está descrito na tabela abaixo.

	muMNACEP / BXhVH5VL1 N297A	mIgG1/hIgG
Tratamentos intradérmicos	100mg + 500ng rhNGF, n=9	100mg + 500ng rhNGF, n=9

No segundo protocolo, onde os tratamentos foram administrados sistemicamente (i.p.), 24 horas antes da injecção de rhNGF na pata, utilizaram-se ratazanas Lewis macho (Charles River, 5-6 semanas, 200g), com 10-12 animais por grupo e 10 grupos experimentais. Aplicaram-se as injecções de forma cega. Um resumo dos tratamentos está descrito na tabela abaixo.

	muMNACEP	mIgG1	BXhVH5VL1 N297A	hIgG
Pré-tratamentos sistémicos i.p. 24 h	1mg/kg n=10 8mg/kg n=10	1mg/kg n=12 8mg/kg n=8	1mg/kg n=10 3mg/kg n=10 8mg/kg n=12	1mg/kg n=10 3mg/kg n=10 8mg/kg n=12
rhNGF intradérmico	500 ng	500 ng	500 ng	500 ng

Ensaio

Todos os animais foram numerados e, de seguida, habituados aos procedimentos de teste de comportamento, 24-48 horas antes do início da experiência. O indicador de comportamento foi a latência da retirada da pata para o teste plantar, como medida da hiperalgesia.

Fizeram-se registos de referência para estabelecer as latências de retirada da pata. Induziu-se sensibilidade

nociceptiva por injecção intradérmica de rhNGF no momento 0 e a sensibilidade nociceptiva comportamental foi monitorizada 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 24 horas e 48 horas após a injecção de rhNGF. Os tratamentos foram administrados de forma cega, como se segue:

Protocolo 1: Administração do tratamento por injecção intradérmica no momento 0.

Protocolo 2: Administração do tratamento por injecção única sistémica IP, 24 horas antes da injecção de rhNGF na pata.

Realizaram-se testes plantares e de von Frey de referência antes de serem administrados tratamentos com fármacos.

Realizaram-se medições de hiperalgesia 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 24 horas e 48 horas após a injecção de rhNGF. Fizeram-se três a quatro registos para cada pata posterior ipsilateral (pata direita, injectada com rhNGF) e contralateral (pata esquerda, não injectada) para a injecção de rhNGF

Os dados provenientes de animais de grupos de tratamento individuais foram recolhidos e calcularam-se as médias e os desvios-padrão para as respostas das patas contralateral e ipsilateral. A presença de hiperalgesia foi indicada por uma redução significativa da latência da retirada da pata (registada em segundos) na pata posterior ipsilateral injectada com rhNGF, quando comparada com a pata contralateral de controlo (por teste *t* emparelhado) e quando comparado com a pré-injecção/pré-tratamento de referência (por ANOVA simples).

Eficácia anti-hiperalgésica intradérmica

Foi comparada a eficácia anti-hiperalgésica de BXhVH5VL1 N297A (Figura 11) e de muMNACEP (Figura 12) (mais mIgG1 e hIgG como controlos negativos) por injecção intradérmica neste modelo de hiperalgesia induzida por NGF.

Quando BXhVH5VL1 N297A e muMNACEP foram co-injectados com rhNGF, não ocorreu um desenvolvimento significativo de hiperalgesia, como indicado por não haver diferenças significativas nas respostas de retirada da pata entre as patas ipsilateral e contralateral (Figuras 11 e 12).

A hiperalgesia nas respostas da pata ipsilateral esteve sempre presente a seguir à co-injecção com os controlos negativos (mIgG1, hIgG).

Os dados estão representados como médias de \pm 95% IC, antes (de referência) e após a injecção intradérmica de 500 ng de rhNGF com os respectivos tratamentos (na seta). A redução significativa na latência de retirada da pata ipsilateral é indicada por '*' '**' ($p<0,05$, $p<0,01$, teste t emparelhado) quando comparado com a retirada da pata contralateral.

Eficácia anti-hiperalgésica sistémica

Foi comparada a eficácia anti-hiperalgésica de BXhVH5VL1 N297A e muMNACEP, mIgG1 e hIgG, por injecção sistémica neste modelo de hiperalgesia induzida por NGF.

Testaram-se três diferentes doses de BXhVH5VL1 N297A e de hIgG de controlo (1, 3 e 8 mg/Kg) (Figura 13). De forma semelhante, testaram-se duas diferentes doses de muMNACEP e

mIgG1, 1 mg/kg e 8 mg/kg (Figura 14). Todos os tratamentos foram administrados i.p. 24 horas antes da injecção intradérmica de rhNGF.

O pré-tratamento sistémico, de 8 e 3 mg/kg de BXhVH5VL1 N297A, impediu consideravelmente o desenvolvimento da hiperalgesia após a injecção de rhNGF, como indicado por não haver diferença significativa entre as respostas de retirada da pata ipsilateral e contralateral (Figura 13).

O pré-tratamento sistémico com o anticorpo parental mMNACEP de murino (8 mg/kg) também impediu o desenvolvimento de hiperalgesia induzida por rhNGF (Figura 14). Contudo, a resposta analgésica geral de BXhVH5VL1 N297A parece ser melhor quando comparada com o anticorpo mMNACEP.

Com a mesma dose, a hiperalgesia nas respostas da pata ipsilateral esteve sempre presente a seguir à co-injecção do controle negativo mIgG1 e hIgG.

Os dados estão representados como médias de \pm 95% IC, antes (de referência) e após a injecção intradérmica de 500 ng de rhNGF com os respectivos tratamentos (na seta). A considerável redução na latência de retirada da pata ipsilateral é indicada por '*' '**' ($p<0,05$, $p<0,01$, teste t emparelhado) quando comparado com a retirada da pata contralateral.

Exemplo 8

Outras experiências *in vivo* que podem ser realizadas para um teste mais aprofundado dos anticorpos/derivados da presente invenção são indicadas a seguir.

Teste da formalina

Os ratos são pré-tratados com o anticorpo/derivado, intraperitonealmente, e 18 horas depois injectados na planta dorsal da pata direita com 5% de formalina. Mede-se o tempo a lamber (tempo gasto lambendo a pata ferida) até 1 hora.

Teste de lesão de constrição crónica

Os ratos são sujeitos a constrição cirúrgica do nervo ciático, a fim de induzir uma alodínea neuropática. Os animais são depois tratados com anticorpos/derivados e é medida a resposta de retirada a um estímulo mecânico localizado no membro ferido em comparação com o membro contralateral.

Modelo de artrite

Os ratos são injectados com adjuvante completo de Freund na base da cauda, de forma intradérmica. Aproximadamente três semanas depois, desenvolvem uma poli-artrite sistémica caracterizada por dores nas articulações. Os animais são tratados com o anticorpo/derivado e o efeito analgésico é avaliado pelo teste de vocalização, que consiste em medir a intensidade da vocalização sob manipulação suave das articulações.

Modelo de dor induzida por carragenina em macacos

Macacos Rhesus são pré-tratados intravenosamente com o anticorpo/derivado. No dia seguinte, os animais são injectados subcutaneamente com carragenina na cauda. Mede-se o tempo de retirada de um estímulo de calor.

Observações de carácter geral

A menos que o contexto indique o contrário, aplicam-se as seguintes observações de carácter geral:

O termo "compreende" não é limitativo na medida em que abrange "incluso", bem como "constando em". Assim, a palavra "compreende" e a variação "comprendendo", serão entendidas como implicando a inclusão de uma determinada entidade, etapa, grupo de entidades ou grupo de etapas, mas não a exclusão de qualquer outra entidade, etapa, grupo de entidades ou grupo de etapas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Lay Line Genomics SPA

<120> ANTICORPOS ANTI-TRKA E SEUS DERIVADOS

<130> 17539EP

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>1

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 6

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 11

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Glu Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 14

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Glu Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Glu Val Lys Leu Met Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gln Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Thr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 17

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala Met Phe Gly Asn Asp Phe Phe Phe Pro Met Asp Arg
100 105 110

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gin Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 19

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Glu Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gin Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 21

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
85 90 95

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 23

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gin Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser
 290 295 300

 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

 Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo anti-TrkA caracterizado por compreender:
uma das seguintes combinações de cadeias leves e pesadas:
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 7
ou SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 9.
2. Um anticorpo, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por se ligar com maior afinidade a TrkA do que
a TrkB.
3. Um anticorpo, de acordo com qualquer uma das
reivindicações precedentes, caracterizado por ser capaz de
bloquear ou reduzir a ligação de NGF ao receptor TrkA.
4. Um anticorpo, de acordo com qualquer uma das
reivindicações precedentes, caracterizado por ser capaz de
bloquear ou reduzir uma ou mais actividades biológicas que
seriam de outra forma induzidas pela ligação de NGF ao
receptor TrkA.
5. Um anticorpo de acordo, com qualquer uma das
reivindicações precedentes, caracterizado por compreender
uma região constante derivada de um não roedor.
6. Um anticorpo, de acordo com qualquer uma das
reivindicações precedentes, caracterizado por compreender
uma região constante humana ou uma região constante com pelo
menos 75% de identidade de sequência com uma região constante
humana.
7. Um anticorpo, de acordo com qualquer uma das
reivindicações precedentes, caracterizado por compreender

uma região constante IgG humana ou uma região constante com pelo menos 75% de identidade de sequência com ela.

8. Um anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por compreender uma região constante que tenha uma ou mais alterações de aminoácidos em relação a uma região constante de imunoglobulina humana que previna/reduza uma ou mais das situações seguintes:

- a) activação do complemento;
- b) lise mediada por complemento;
- c) activação de células T;
- d) ligação a um receptor Fc.

9. Um anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por proporcionar um valor de DO a 450/630 nm maior que 0,1 num ensaio ELISA de ligação TrkA-IgG.

10. Um anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por proporcionar um aumento na coloração FACS de células TF1, num ensaio de ligação celular à base de FACS de expressão de TrkA na superfície de células TF1, que seja um aumento superior a 1,0 vezes.

11. Um anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por ter um valor de K_D menor que $4,18 \times 10^{-8}$ M em relação à ligação TrkA-IgG num ensaio de análise de ressonância plasmónica superficial, onde TrkA-IgG é imobilizado num *chip* sensor CM-5

12. Um anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por apresentar pelo menos 90% de humanização, medida nas regiões estruturais totais da região variável de pelo menos uma cadeia.

13. Um anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por apresentar pelo menos 95% de humanização, medida nas regiões estruturais totais da região variável de pelo menos uma cadeia.

14. Um anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 ou 13, caracterizado por apresentar pelo menos a percentagem de humanização dada numa das referidas reivindicações, em relação às regiões estruturais para ambas as cadeias leves e pesadas.

15. Um derivado de um anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por ser:

- a) um fragmento do referido anticorpo, onde o fragmento está sob a forma de cadeias ScFv, ser um fragmento de Fv ou Fab,
- b) um multímero de fragmentos tais como minicorpos, ScFv bis (ou superior), diacorpos, triacorpos, tetracorpos, multímeros Fab,
- c) um produto de fusão do fragmento de anticorpo referido ou multímero de fragmentos e uma outra fracção.

16. Um derivado, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por ser um produto de fusão e uma outra fracção ser um agente seleccionado entre os seguintes: um agente de diagnóstico, um agente terapêutico, um agente de marcação, um agente que aumenta a semi-vida e/ou que reduz a imunogenicidade do referido derivado num hospedeiro humano.

17. Um seu derivado, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o agente terapêutico ser uma citotoxina.

18. Um anticorpo ou seu derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por ser PEGuilado.

19. Um anticorpo ou derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por estar numa forma imobilizada.

20. Um anticorpo ou derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, para uso em medicina.

21. Um anticorpo ou derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, para uso em tratamento de dor.

22. Um anticorpo ou derivado. de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, para uso em tratamento de dor crónica.

23. Um anticorpo ou derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, para uso em tratamento de dor aguda.

24. Um anticorpo ou derivado. de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, para uso em tratamento de dor associada a uma ou mais das situações seguintes: pancreatite, pedras nos rins, endometriose, DII, doença de Crohn, aderências pós-cirúrgicas, pedras na vesícula, dores de cabeça, dismenorréia, dores musculares, entorses, dor visceral, quistos nos ovários, prostatite, cistite, cistite intersticial, dor pós-operatória, enxaqueca, neuralgia do trigémeo, dor de queimaduras e/ou de feridas, dor associada a trauma, dor neuropática, dor associada a lesões músculo-

esqueléticas, artrite reumatóide, osteoartrite, espondilite anquilosante, patologias periarticulares, dor oncológica, dor de metástases ósseas, infecção por HIV.

25. Um anticorpo ou derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, para uso em tratamento de cancro, de distúrbio neuronal (por exemplo, um distúrbio neurodegenerativo), doença de Alzheimer, *Diabetes mellitus*, de um distúrbio viral, de um distúrbio mediado por HIV, de lepra ou de um distúrbio inflamatório.

26. Um anticorpo ou derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 25, caracterizado por o tratamento envolver ADCC.

27. Uma combinação de um anticorpo ou derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, e um analgésico, para administração simultânea, sequencial ou concertada em medicina.

28. Uma combinação de um anticorpo ou derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, e NGF, para administração simultânea, sequencial ou concertada em medicina.

29. Uma combinação de um anticorpo ou derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, e outro anticorpo anti-TrkA ou seu derivado, para administração simultânea, sequencial ou concertada em medicina.

30. Uma composição farmacêutica caracterizada por compreender um anticorpo ou seu derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, e um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

31. Uma composição farmacêutica caracterizada por compreender um anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, e outro agente farmaceuticamente activo.

32. Uma composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 31, caracterizada por o outro agente referido ser um ou mais de:

- a) um agente analgésico;
- b) outro anticorpo anti-TrkA ou seu derivado;
- c) NGF;
- d) um agente anti-cancro.

33. Um anticorpo ou seu derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, para uso em diagnóstico ou prognóstico.

34. Um anticorpo ou seu derivado para uso em diagnóstico ou prognóstico de qualquer das doenças ou distúrbios especificados nas reivindicações 21 a 25.

35. Um ácido nucleico que codifica um anticorpo ou seu derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19.

36. Um vector compreendendo um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 35.

37. Um mamífero transgénico não humano que expressa um anticorpo ou seu derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 19, ou que possa ser induzido a fornecer essa expressão.

38. Um *kit* de partes que compreende um anticorpo ou derivado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 19, juntamente com instruções que orientam a sua utilização por um sujeito como um analgésico.

Figura 1a

Alinhamento de Sequências

CDRs sublinhadas a partir de EP1181318

CADEIA PEKADA

WHEP
SYK1185GCC1VPGCSSLSCASGFTTSTYTMGAGGTYIPTVPEKLEENAVAYSGGGSTTIPDTNGKFTISDWNKNTYQNSLSEKDTAVTCARGAMGDIITFMDTGQGTIVSS
 (SEQ IN No. 15)
 J-23*G1
EVK1185GCC1VPGCSSLSCASGFTTSTYTMGAGGTYIPTVPEKLEENAVAYSGGGSTTIPDTNGKFTISDWNKNTYQNSLSEKDTAVTCARGAMGDIITFMDTGQGTIVSS
 (SEQ IN No. 19)
 JH4

YTDVNGQGTIVSS
 (SEQ IN No. 20)
 BEVH1
EVK1185GCC1VPGCSSLSCASGFTTSTYTMGAGGTYIPTVPEKLEENAVAYSGGGSTTIPDTNGKFTISDWNKNTYQNSLSEKDTAVTCARGAMGDIITFMDTGQGTIVSS
 (SEQ IN No. 1)
 BEVH2
EVK1185GCC1VPGCSSLSCASGFTTSTYTMGAGGTYIPTVPEKLEENAVAYSGGGSTTIPDTNGKFTISDWNKNTYQNSLSEKDTAVTCARGAMGDIITFMDTGQGTIVSS
 (SEQ IN No. 2)
 BEVH3
EVK1185GCC1VPGCSSLSCASGFTTSTYTMGAGGTYIPTVPEKLEENAVAYSGGGSTTIPDTNGKFTISDWNKNTYQNSLSEKDTAVTCARGAMGDIITFMDTGQGTIVSS
 (SEQ IN No. 3)
 BEVH4
EVK1185GCC1VPGCSSLSCASGFTTSTYTMGAGGTYIPTVPEKLEENAVAYSGGGSTTIPDTNGKFTISDWNKNTYQNSLSEKDTAVTCARGAMGDIITFMDTGQGTIVSS
 (SEQ IN No. 4)
 BEVH5
EVK1185GCC1VPGCSSLSCASGFTTSTYTMGAGGTYIPTVPEKLEENAVAYSGGGSTTIPDTNGKFTISDWNKNTYQNSLSEKDTAVTCARGAMGDIITFMDTGQGTIVSS
 (SEQ IN No. 5)
 BEVH6
EVK1185GCC1VPGCSSLSCASGFTTSTYTMGAGGTYIPTVPEKLEENAVAYSGGGSTTIPDTNGKFTISDWNKNTYQNSLSEKDTAVTCARGAMGDIITFMDTGQGTIVSS
 (SEQ IN No. 17)
 BEVH7
EVK1185GCC1VPGCSSLSCASGFTTSTYTMGAGGTYIPTVPEKLEENAVAYSGGGSTTIPDTNGKFTISDWNKNTYQNSLSEKDTAVTCARGAMGDIITFMDTGQGTIVSS
 (SEQ IN No. 6)

Figure 1b

LIGHT CHAIN:

DIVLVQSPATLSI SPERATLSCSASSSSVSYTH-WYQQKPGQSPRLIYD-A
 (SEQ IN No. 16)

LE*01

EIVLVQSPATLSI SPERATLSCSASSSSVSYTH-WYQQKPGQSPRLIYD-A
 (SEQ IN No. 21)

JKL

..... WTEGQSTKEIK

(SEQ IN No. 22)

BKVVL1

EIVLVQSPATLSI SPERATLSCSASSSSVSYTH-WYQQKPGQSPRLIYD-A
 (SEQ IN No. 7)

BKVVL2

EIVLVQSPATLSI SPERATLSCSASSSSVSYTH-WYQQKPGQSPRLIYD-A
 (SEQ IN No. 8)

BKVVL3

EIVLVQSPATLSI SPERATLSCSASSSSVSYTH-WYQQKPGQSPRLIYD-A
 (SEQ IN No. 9)

BKVVL4

QIVLVQSPATLSI SPERATLSCSASSSSVSYTH-WYQQKPGQSPRLIYD-A
 (SEQ IN No. 10)

BKVVL5

QIVLVQSPATLSI SPERATLSCSASSSSVSYTH-WYQQKPGQSPRLIYD-A
 (SEQ IN No. 11)

BKVVL6

EIVLVQSPATLSI SPERATLSCSASSSSVSYTH-WYQQKPGQSPRLIYD-A
 (SEQ IN No. 12)

BKVVL7

QIVLVQSPATLSI SPERATLSCSASSSSVSYTH-WYQQKPGQSPRLIYD-A
 (SEQ IN No. 13)

BKVVL8

QIVLVQSPATLSI SPERATLSCSASSSSVSYTH-WYQQKPGQSPRLIYD-A
 (SEQ IN No. 14)

KVVLK0

DIVLVQSPATLSI SPERATLSCSASSSSVSYTH-WYQQKPGQSPRLIYD-A
 (SEQ IN No. 15)

Figura 2

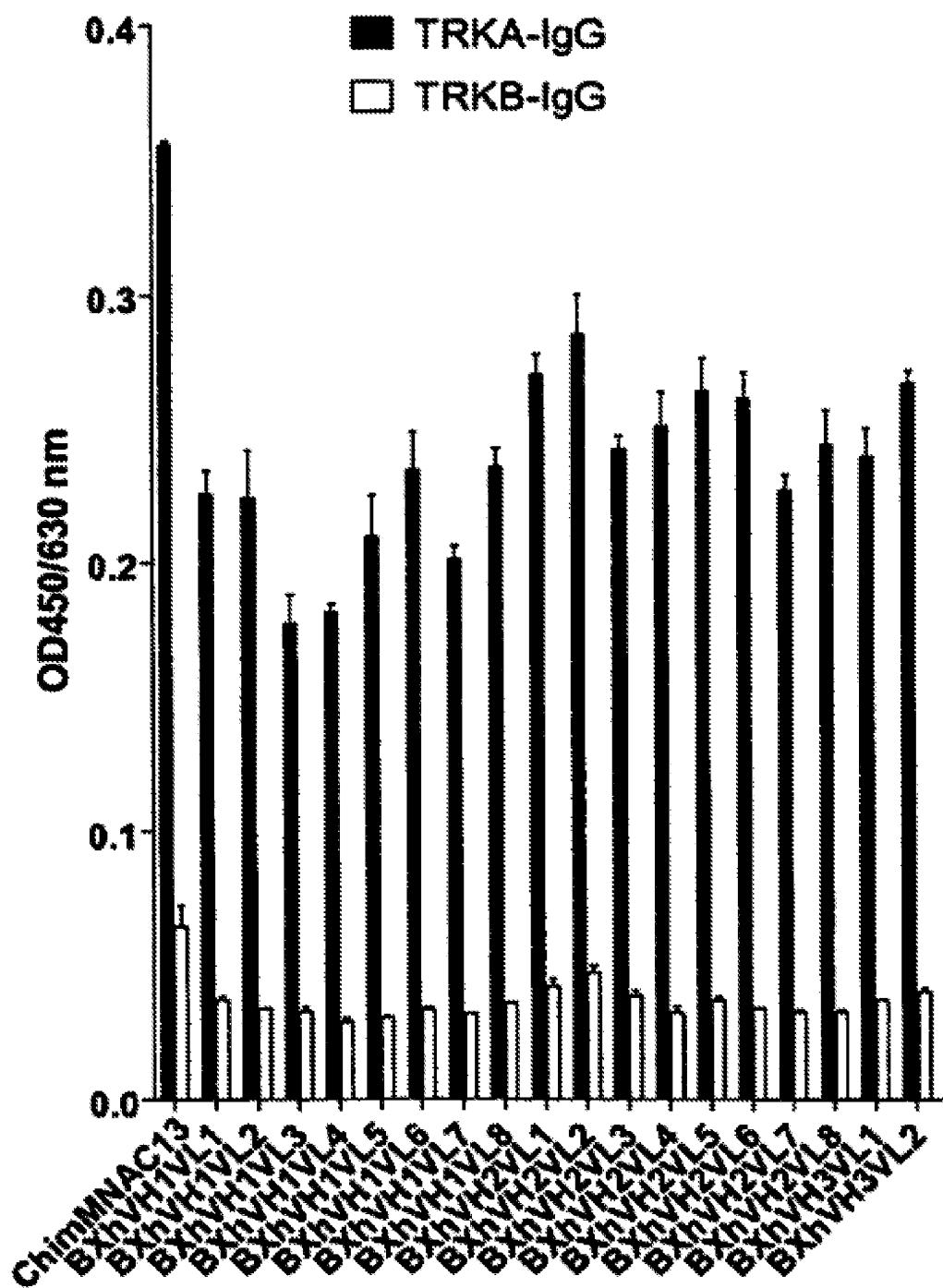


Figura 2 (continuação)

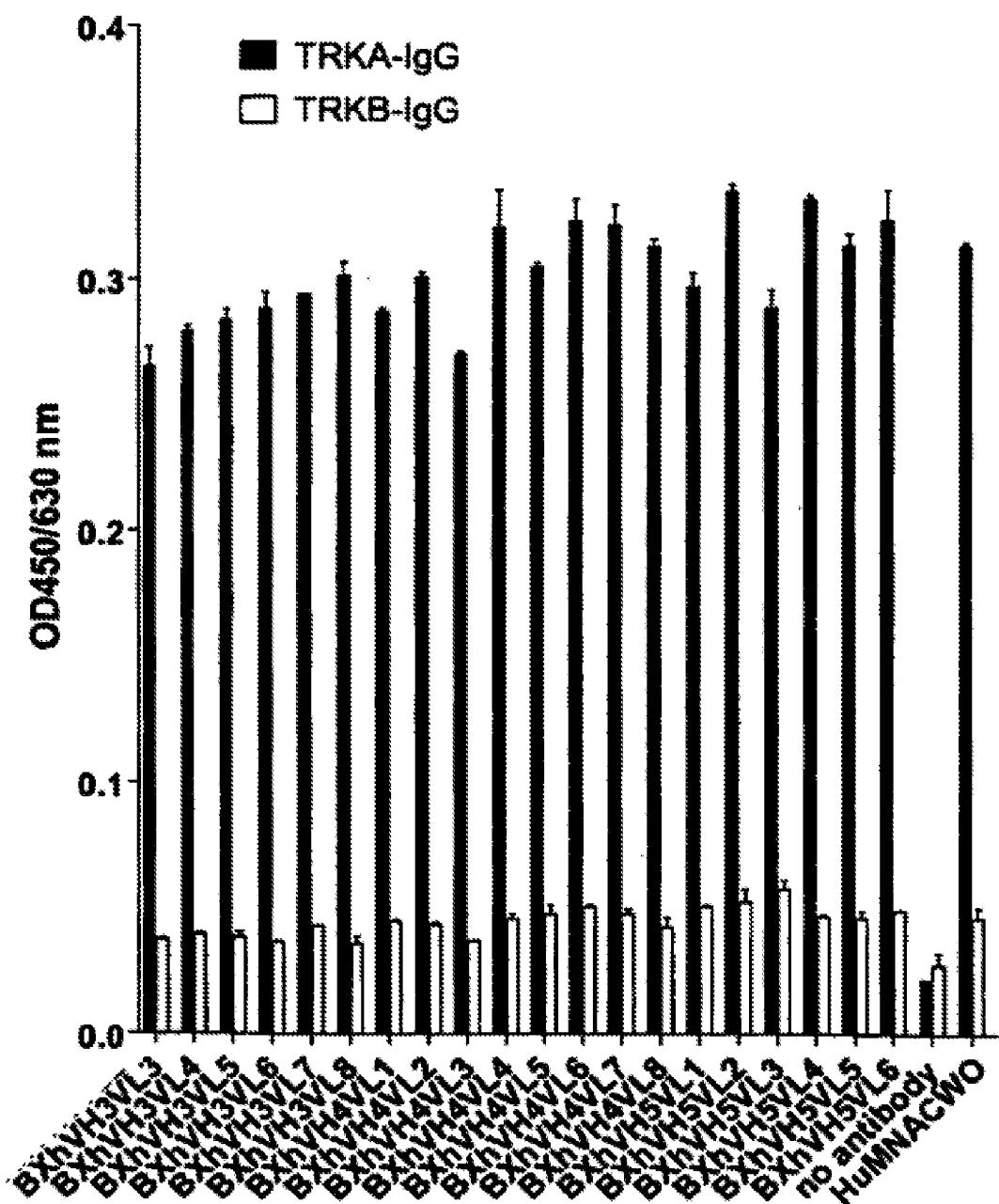


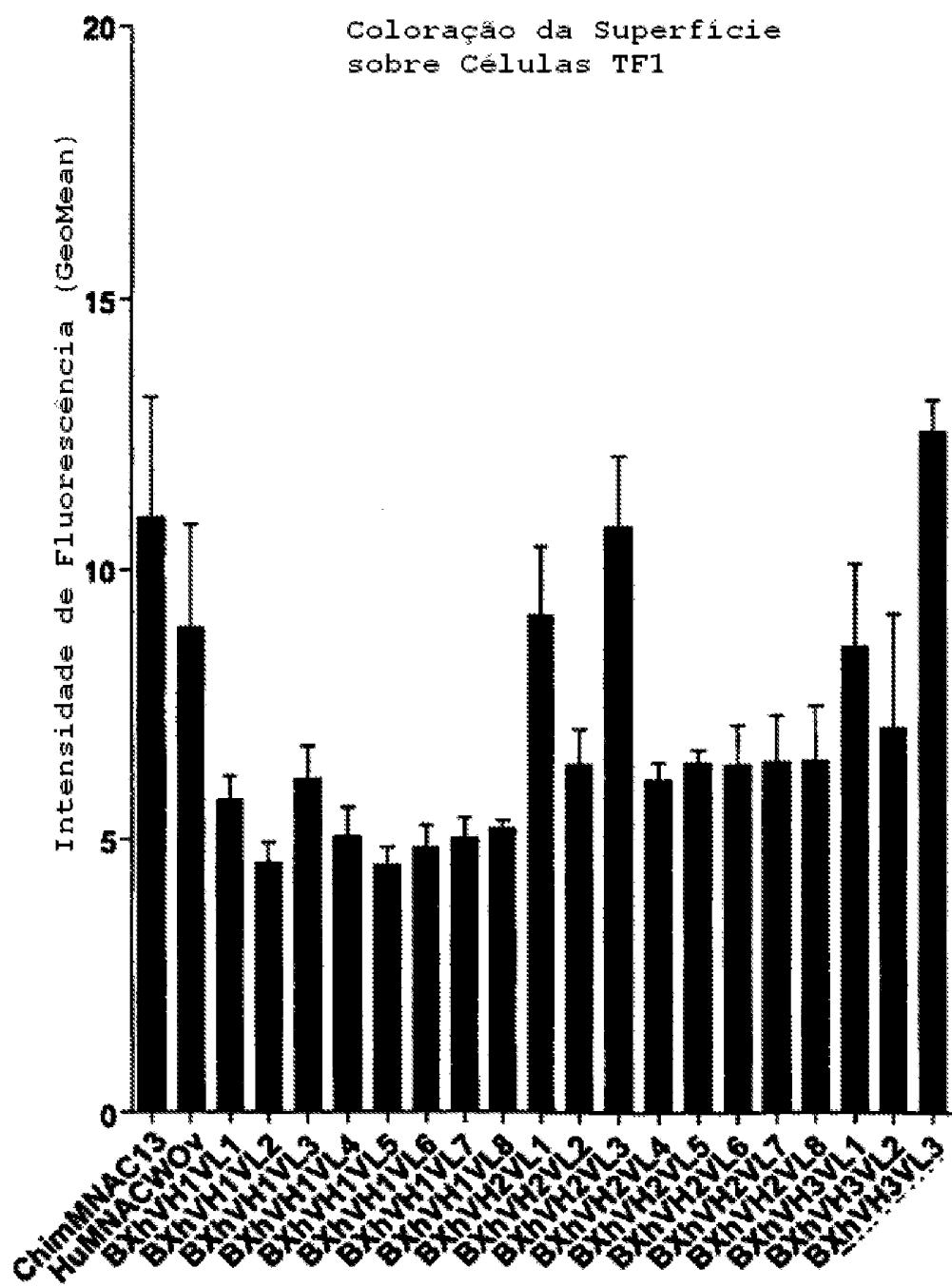
Figura 3

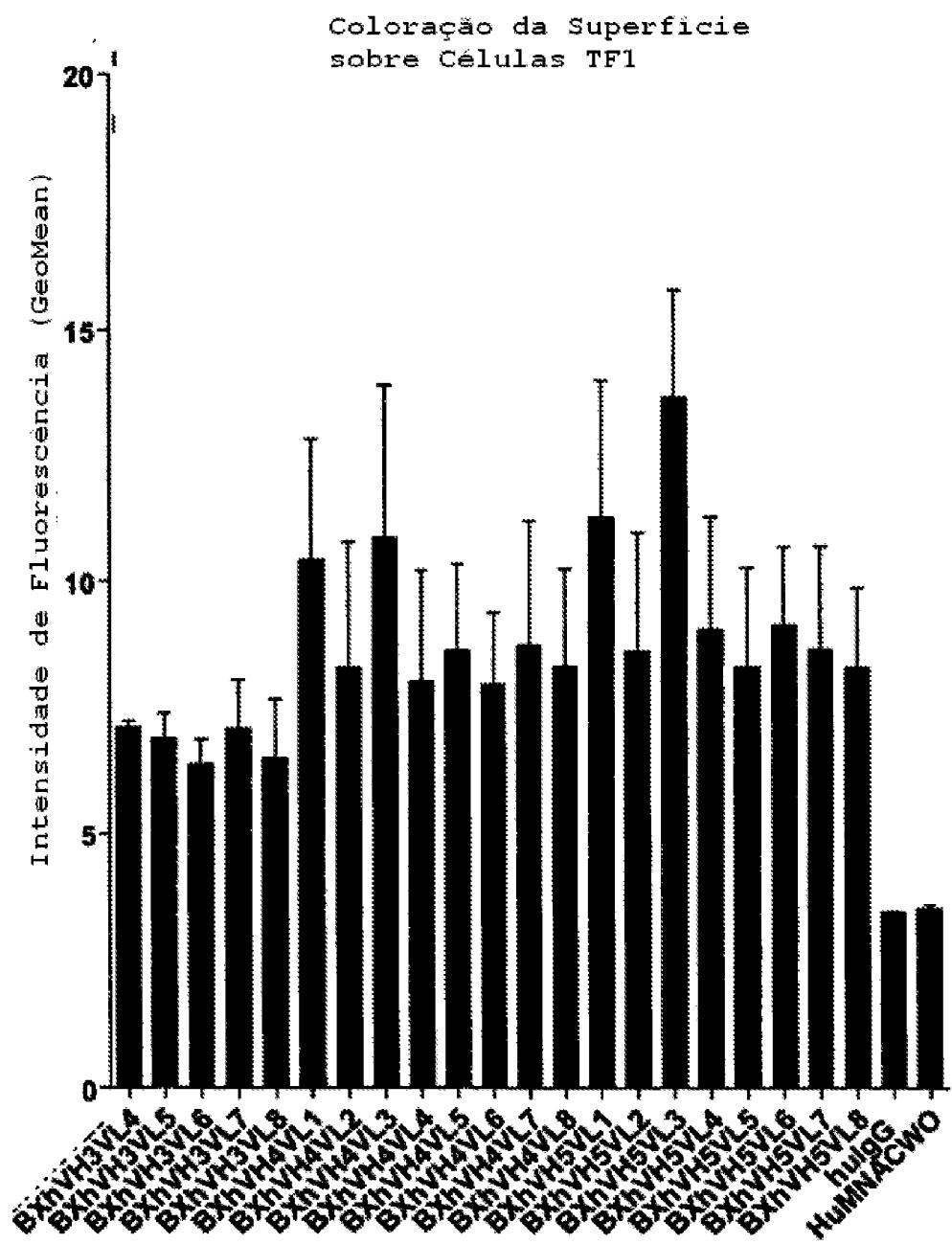
Figura 3 (continuação)

Figura 4
Ligaçāo a TF1

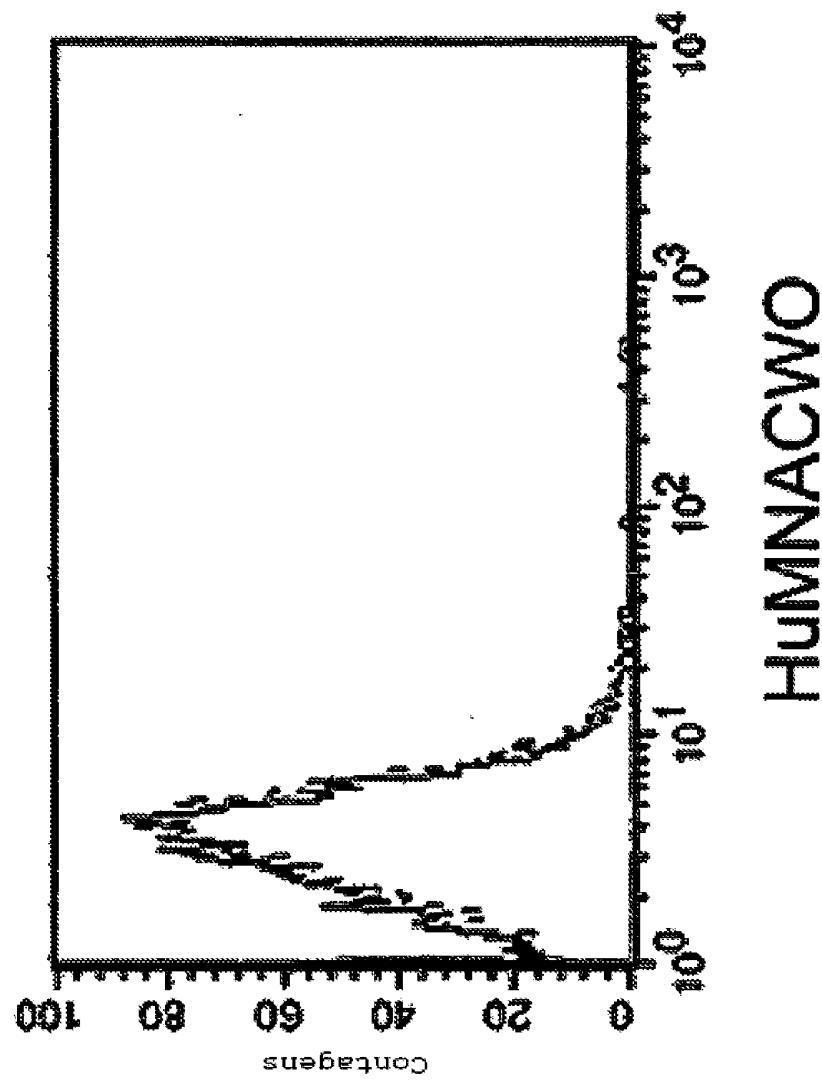


Figura 4 (continuação)

Ligaçāo a TF1 - Exp 1

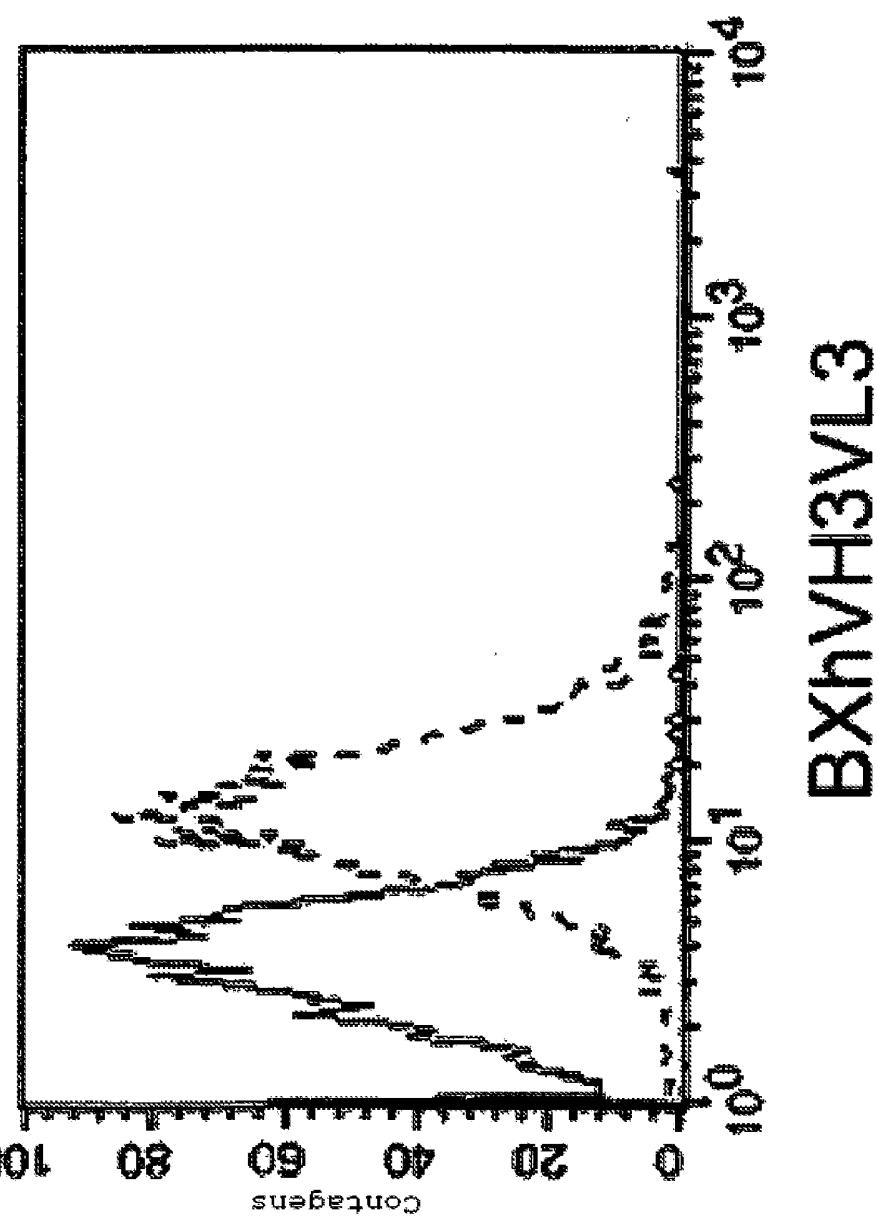


Figura 4 (continuação)

Ligação a TF1 - Exp 1

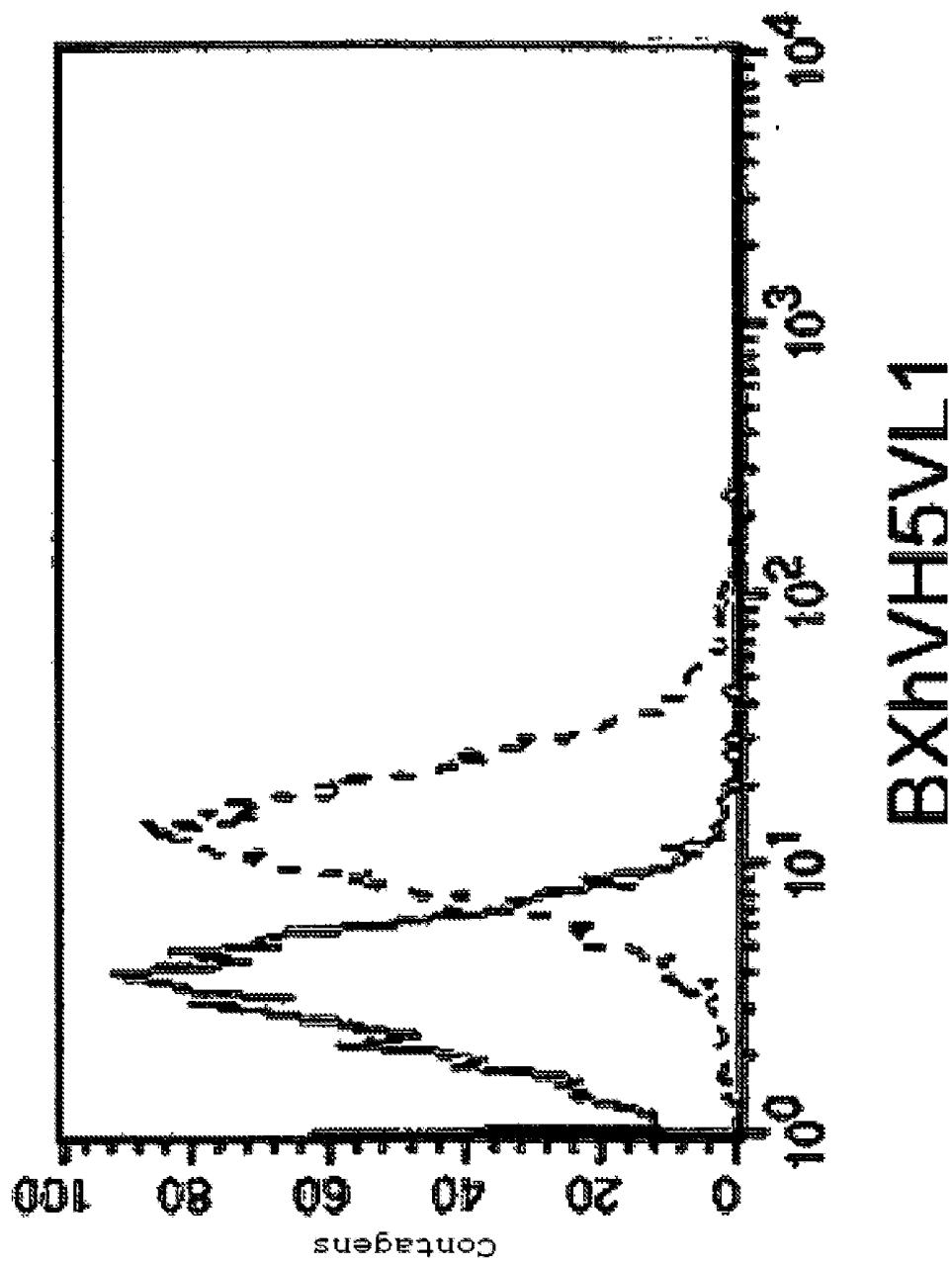
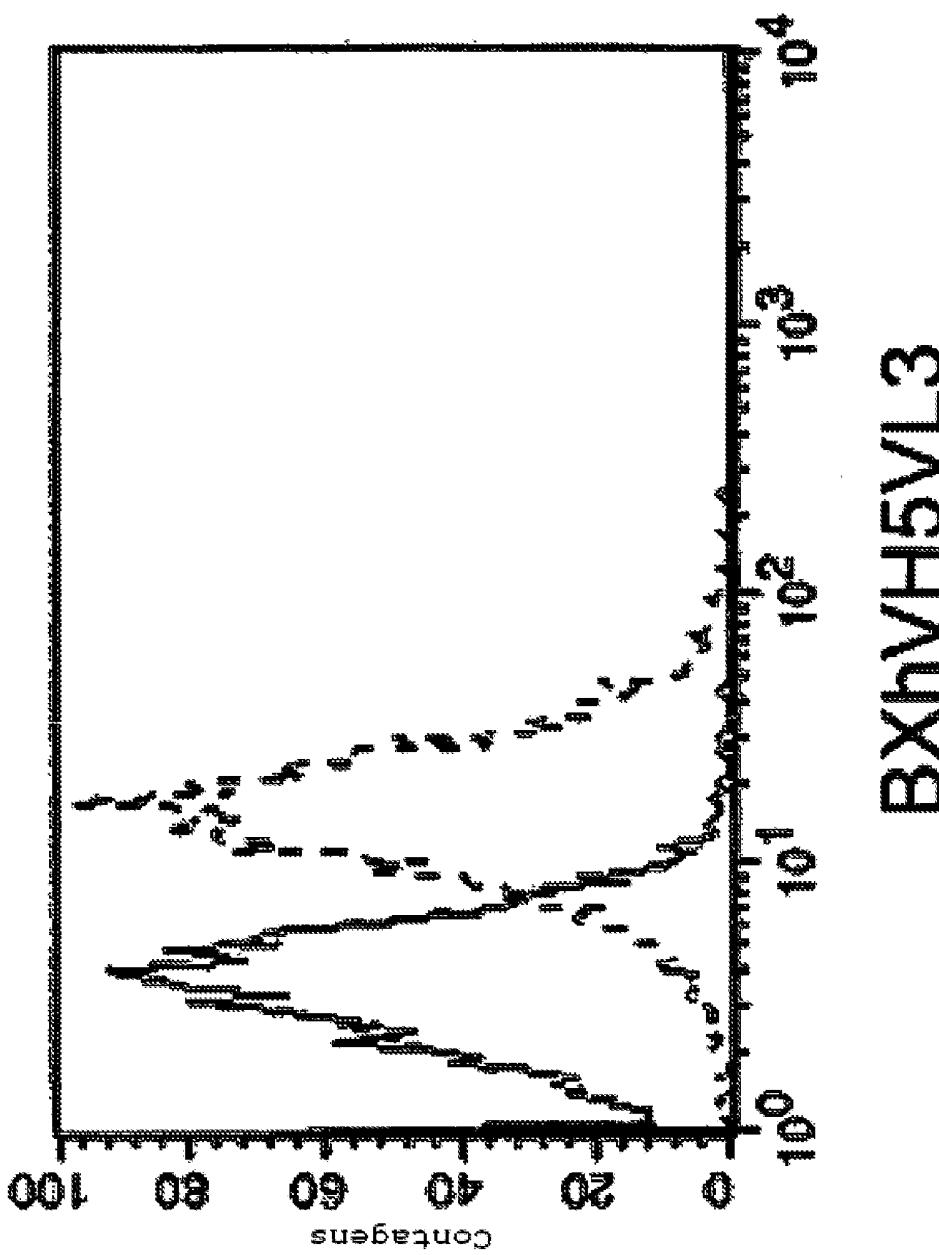


Figura 4 (continuação)

Ligação a TFI - Exp 1



BXhVH5VL3

Figura 4 (continuação)

Ligaçāo a TF1 - Exp 1

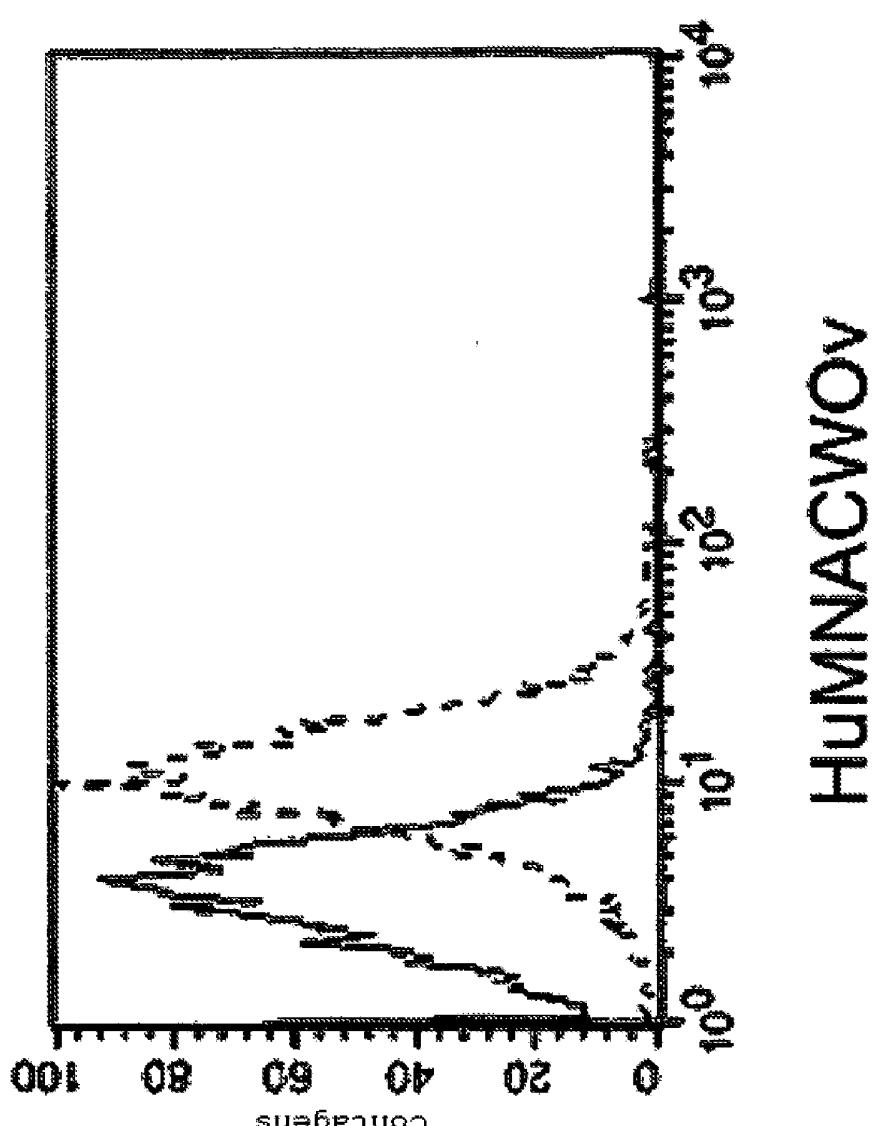


Figura 4 (continuação)

Ligaçāo a TF1 - Exp 1

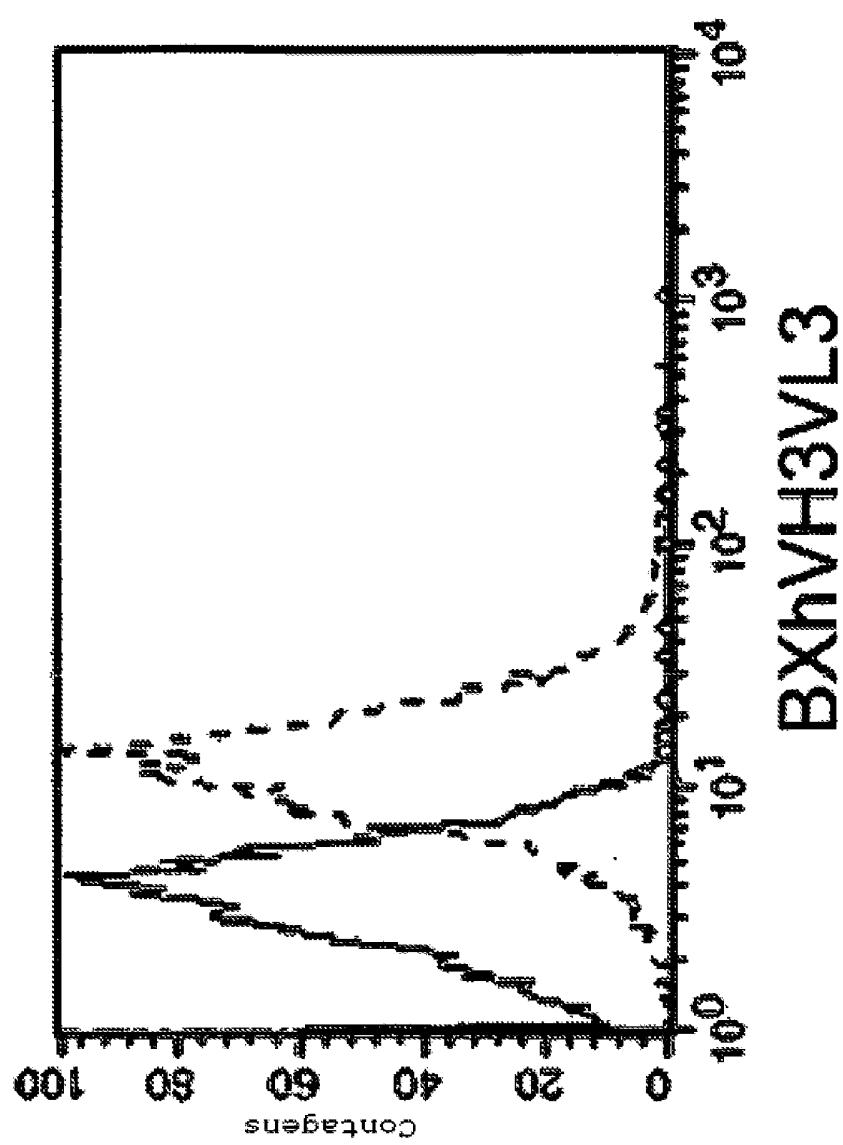


Figura 4 (continuação)

Ligaçāo a TF1 - Exp 1

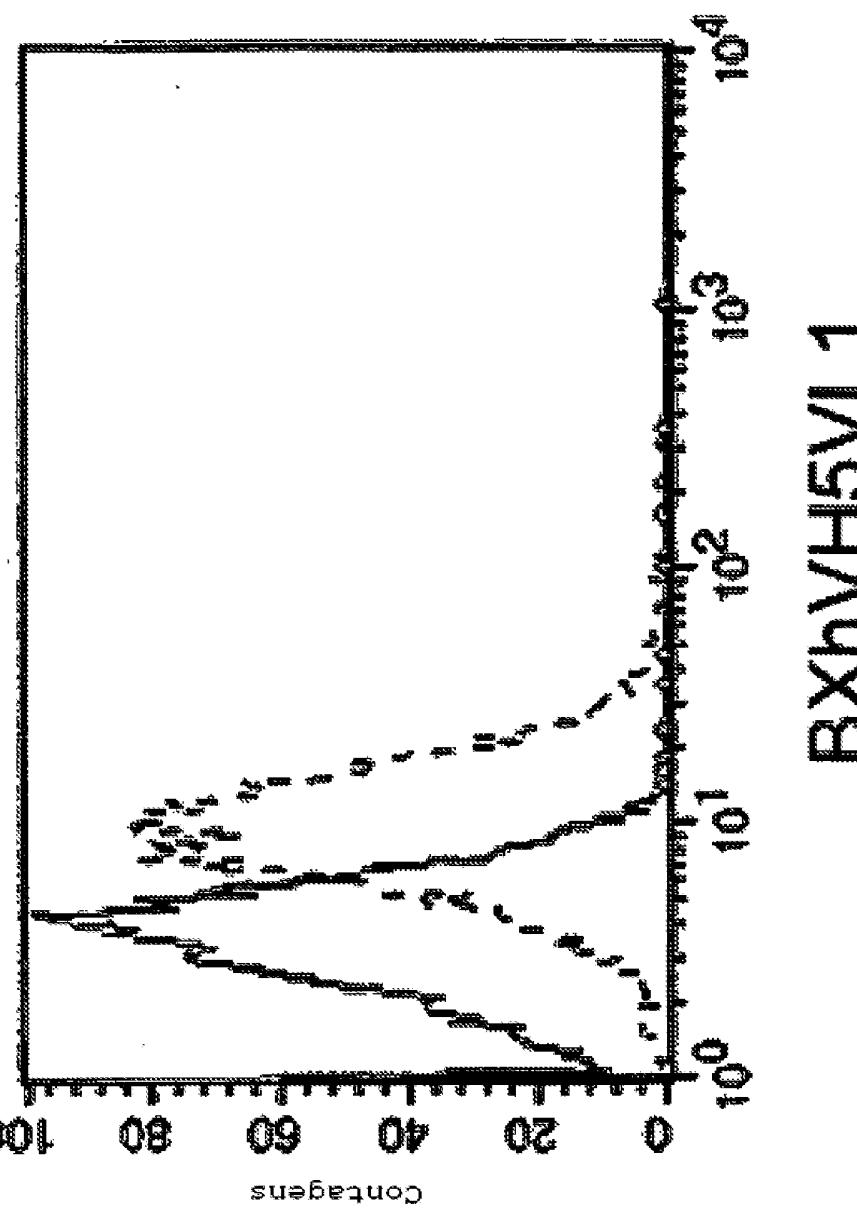
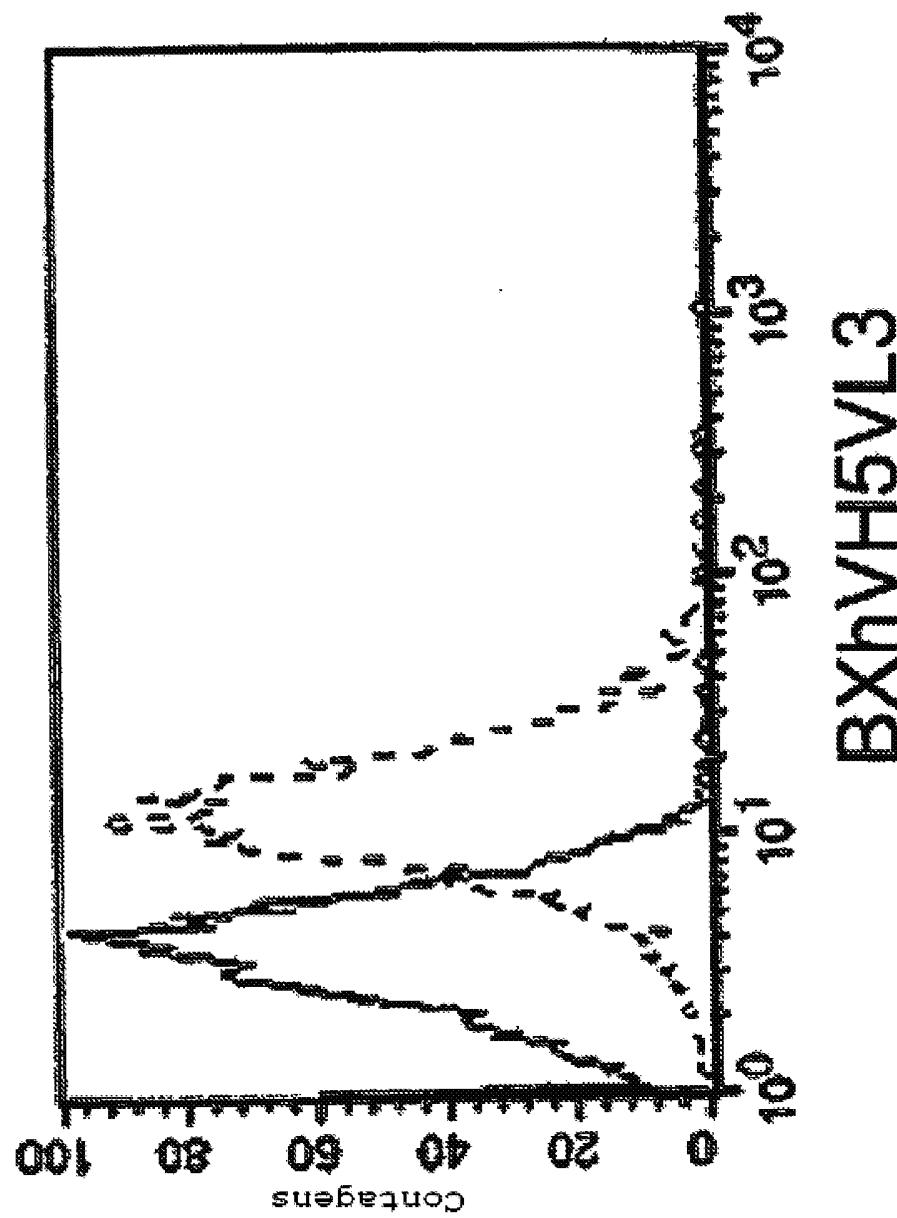


Figura 4 (continuação)

Ligação a TF1 - Exp II



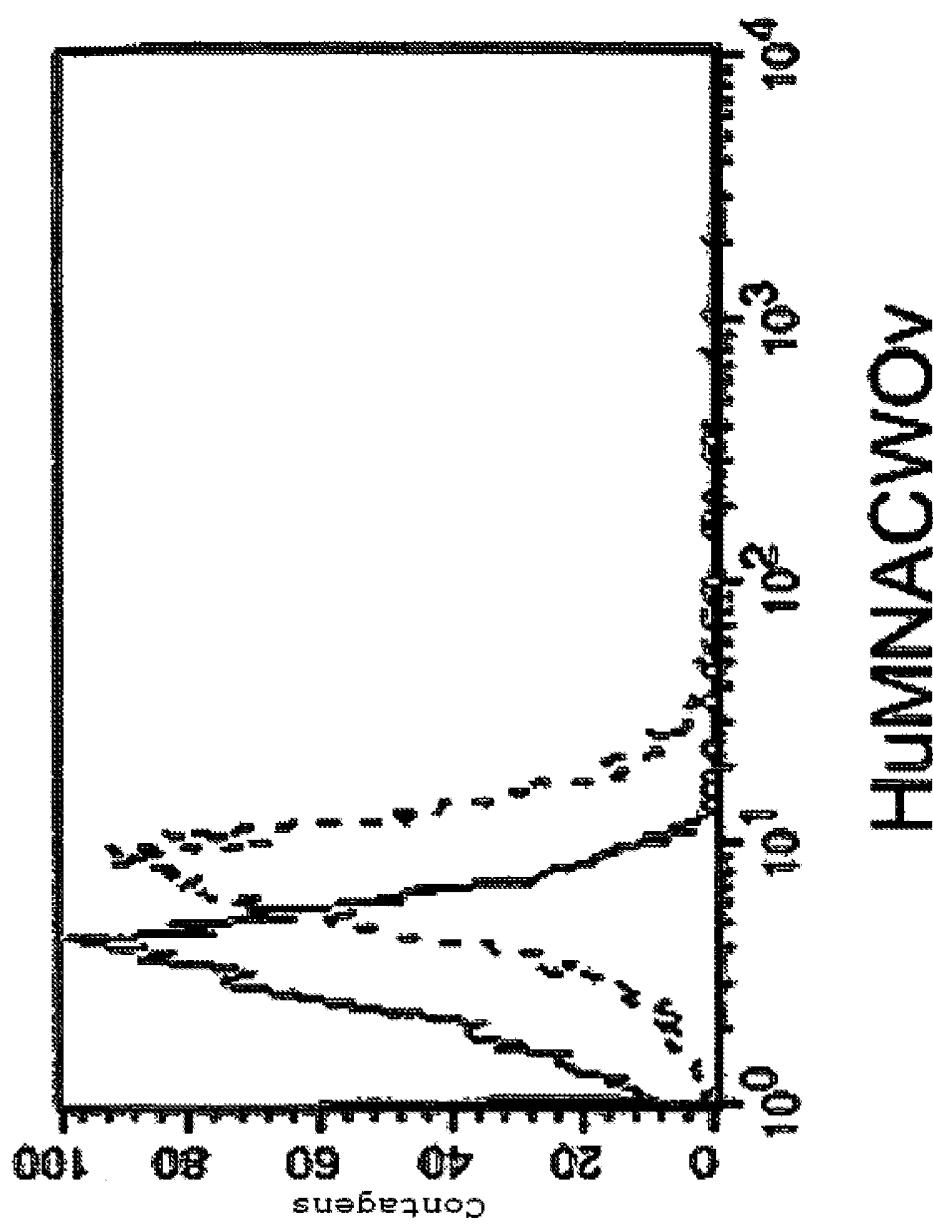


Figura 4 (continuação)

Ligaçāo a TF1 - Exp II

Figura 5

Teste de Proliferação de TF1
MuMNACEP

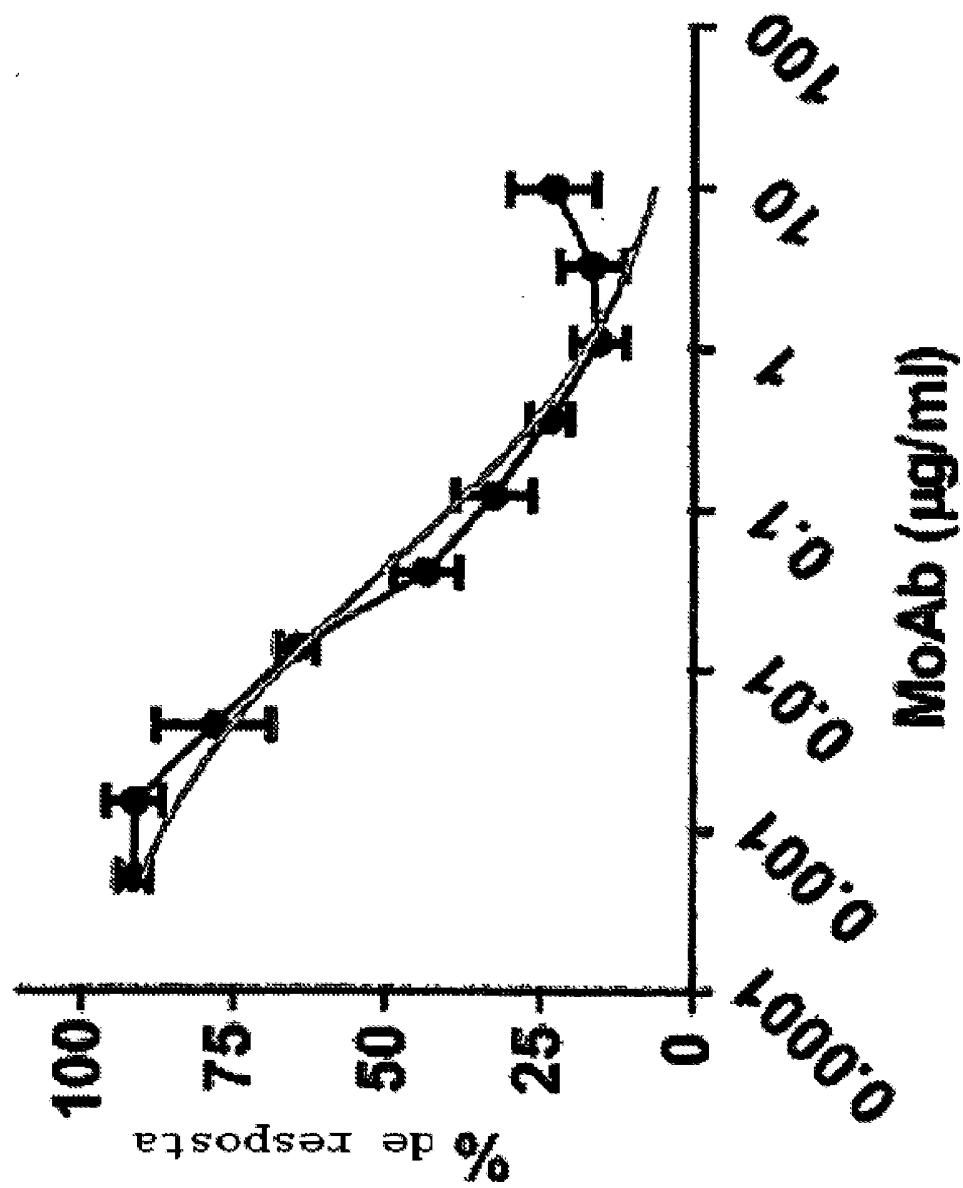
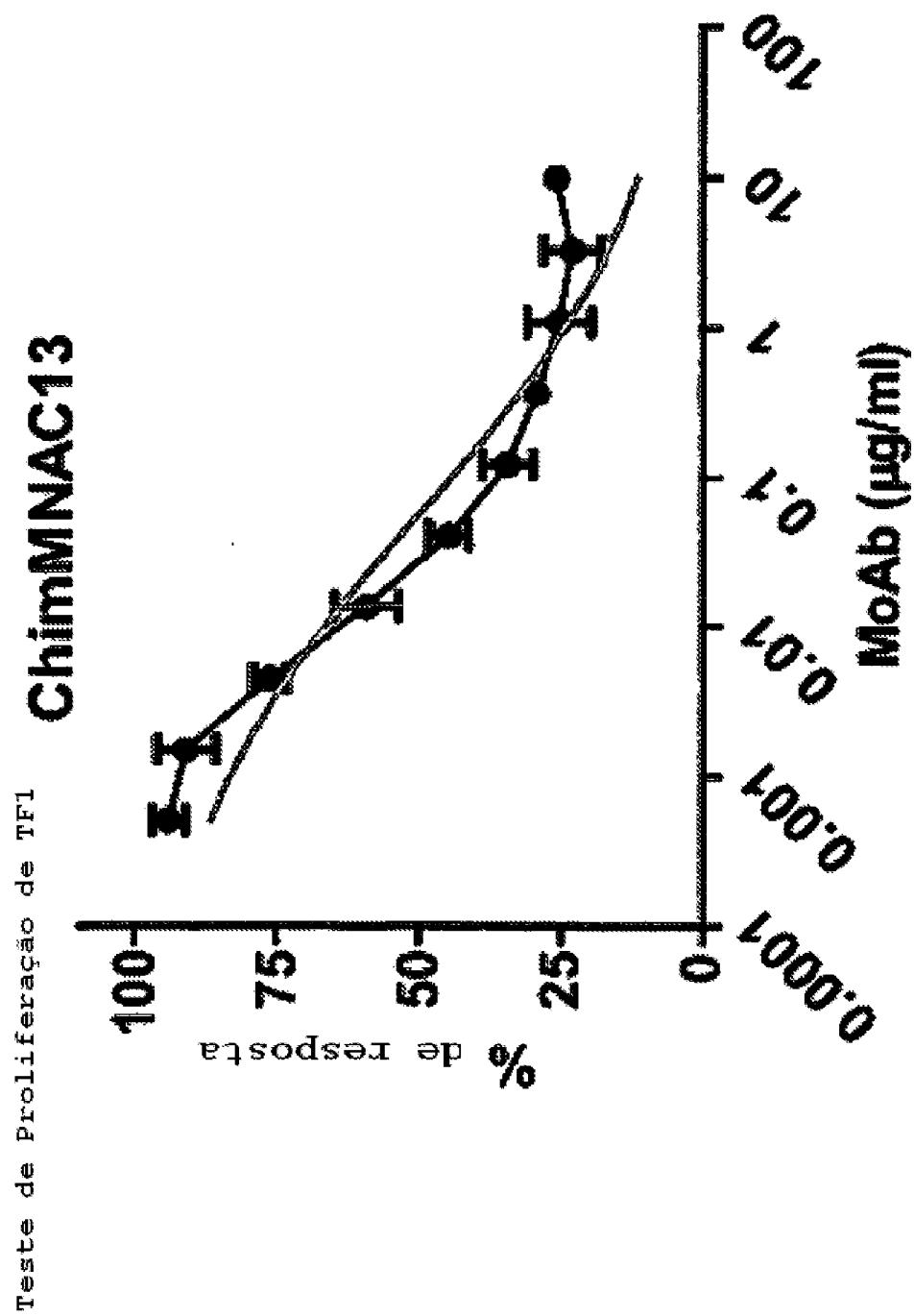


Figura 5 (continuação)



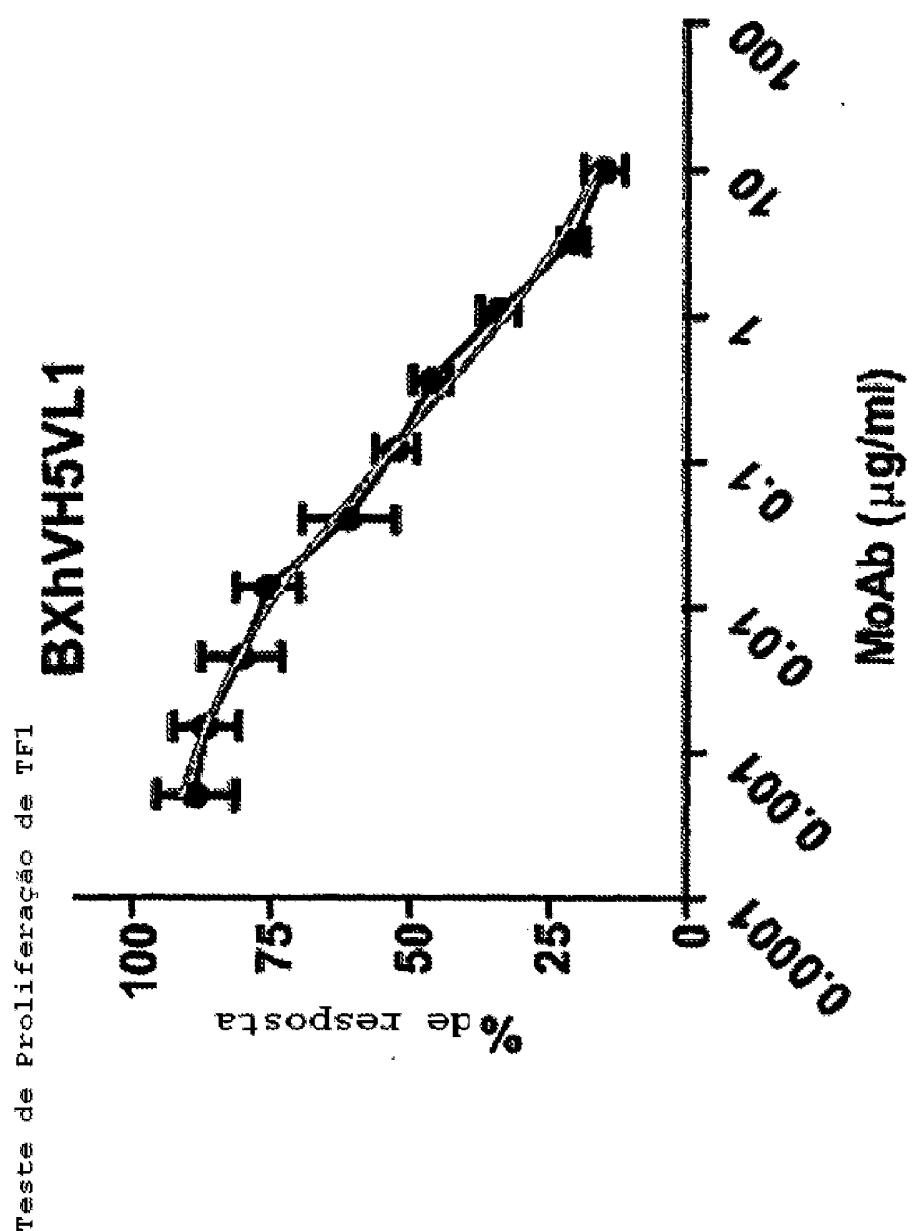


Figura 5 (continuação)

Figura 5 (continuação)

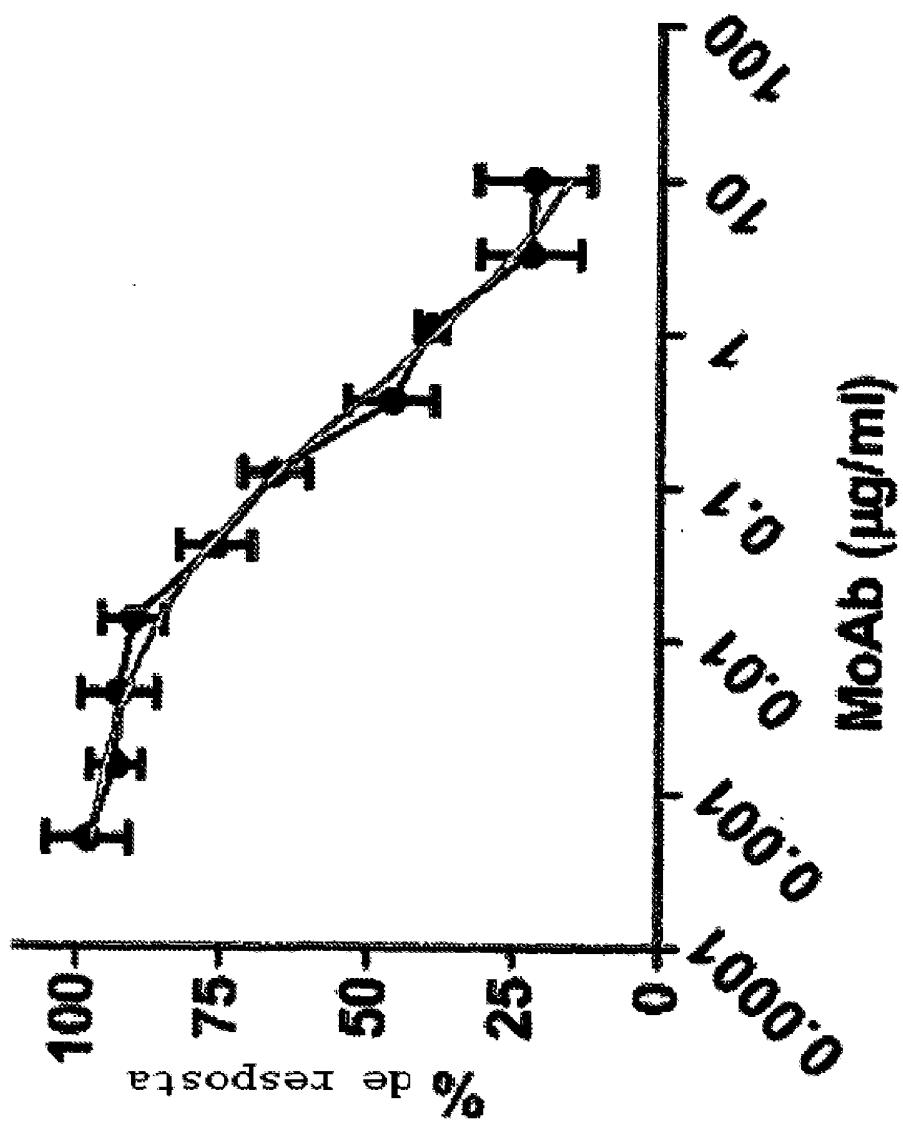
Teste de Proliferação de TF1
BXhVH3VL3

Figura 5 (continuação)

Teste de Proliferação de TF1

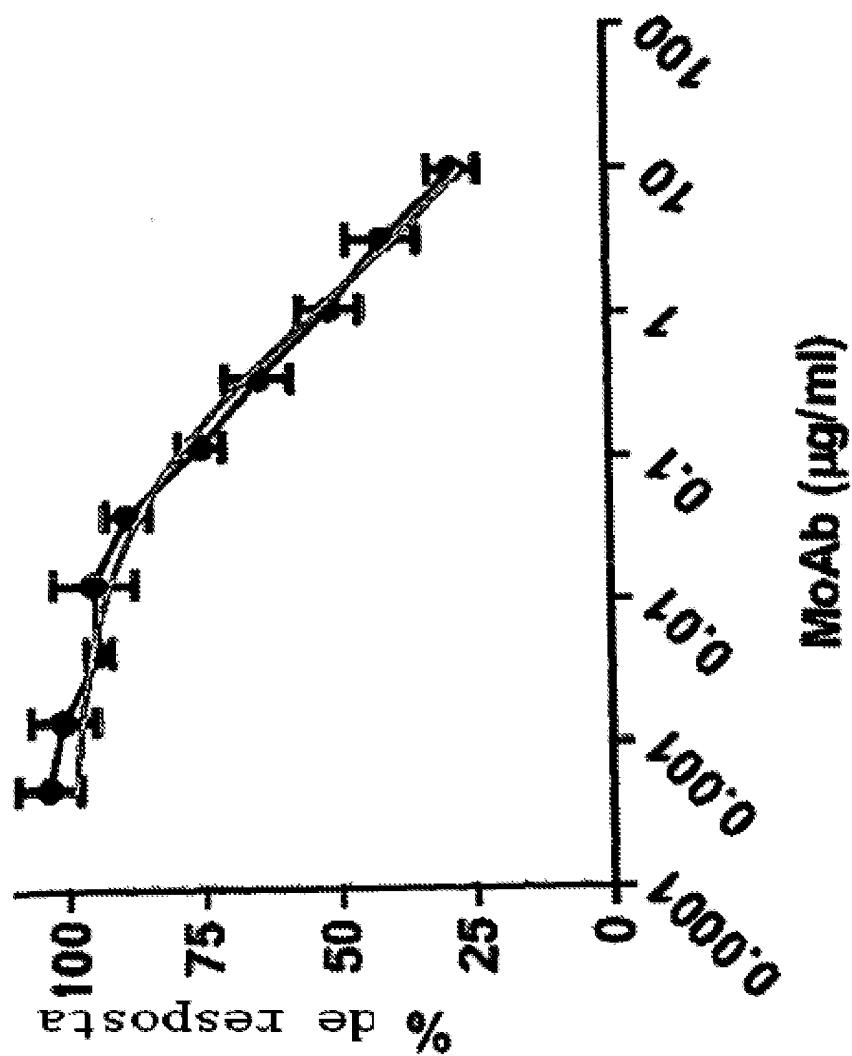
BXhVH5VL3

Figura 5 (continuação)

Teste de Proliferação de TF1 HumNACW0

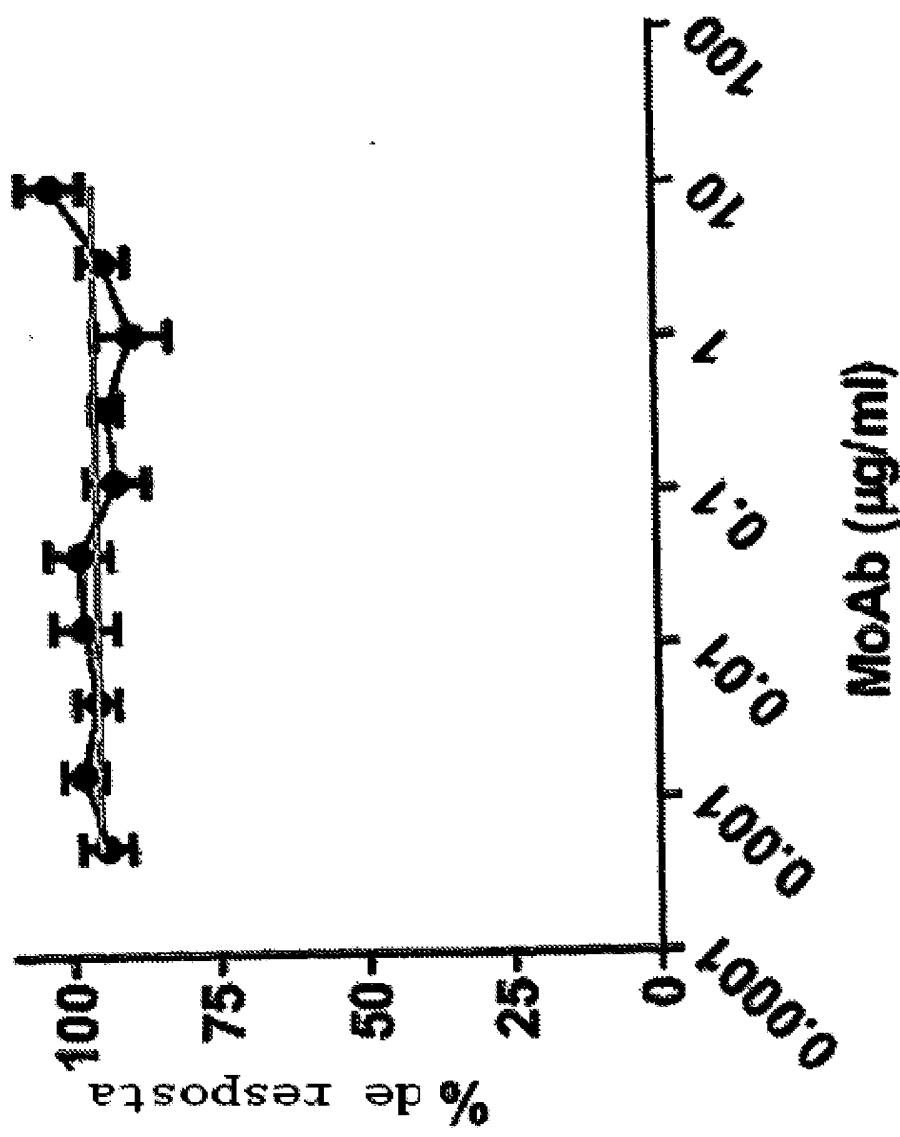


Figura 5 (continuação)

Teste de Proliferação de TF1 HulgStd

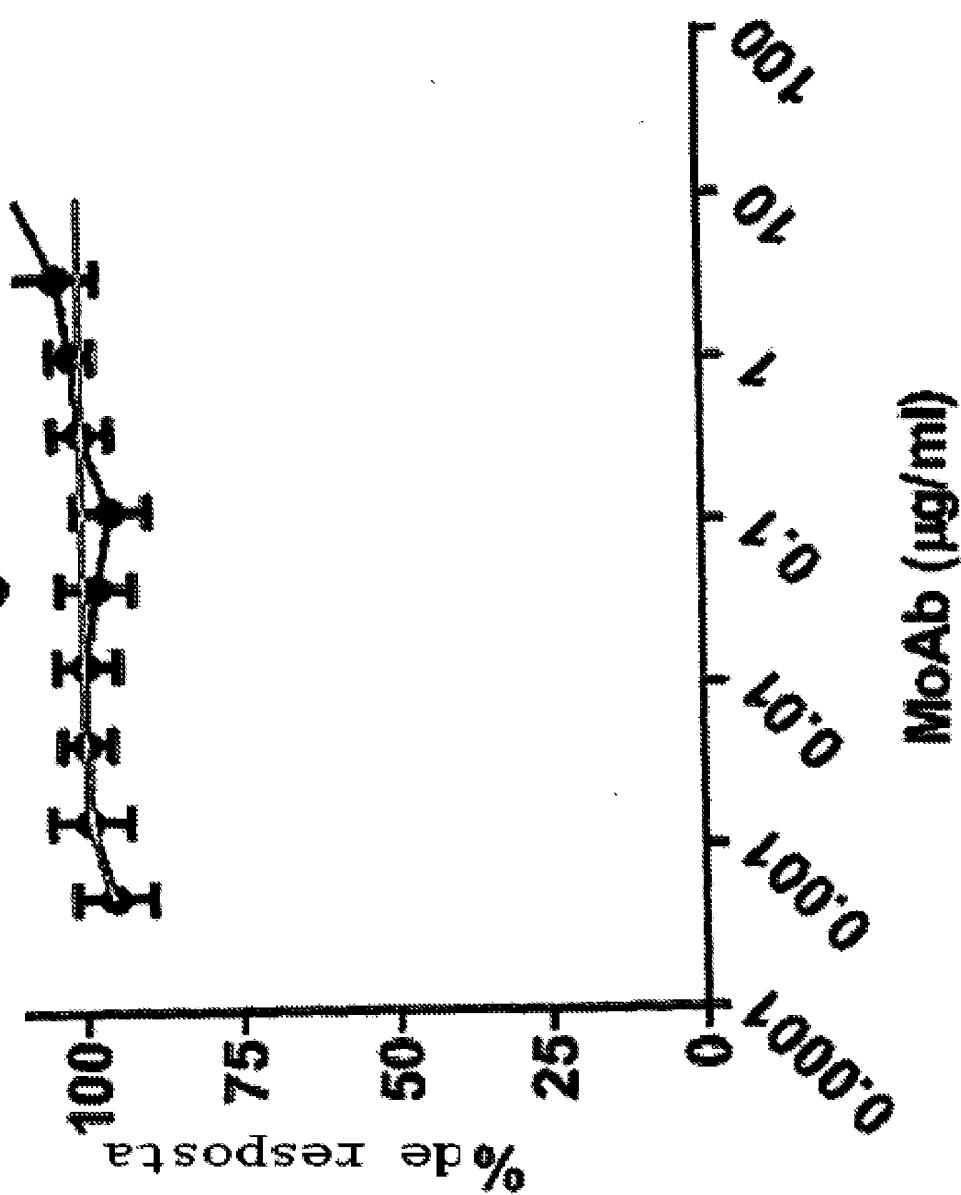


Figura 6

Cadeia pesada B_{XhVH5} com região constante

EVKLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTM**SWRQTPGK**
RLEWWAYISKGGGSTYY**PDTVKGRFTI**SRDNSKINTLY**LQM**MNSLRA
EDTAVYYCARGAMYGNDFFYPMIDYWGQGT**TVSSASTKGPSV**
FPLAPSSKSTSGGTAA**LGCLVKD**YFPEPVT**VSWNSGALTSGVHTF**
PAVLQSSGLYSLSSVV**TVPSSSLGT**QT**TYICNVN**H**KPSNTKV**D**KKV**
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG**GPSVF**FLFP**KPKDTLM**ISRT**PEVT**
CVVVDVSHE**DPEVKFNWYVDGVEVHN**AKTKPREE**QYNSTYRVV**
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEGLHNHYT
QKSLSLSPGK

Cadeia leve B_{XhV11} com região constante

EIVLTQSPATL**LSLSPGERATL**SCASSSVSY**MHWYQQKPGQAPRL**
LIYTTSNLASGIPARFSGSGTDFTL**TISSLEPEDFAVYYCHQWS**
SYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC

Figura 7

Cadeia pesada BXhVH5N2974 com região constante

EVKLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTYSTYTMWVVRQTPGKRLEWWAYISKGSSSTYYPDTV
KGRTTISRDNSKNTLYLQMNLRAEDTAVYYCARGAMYGNDEFYPMDWGQGTTVTVSSASTKG
PSVTPLAPESSKSTSQQGTAAIGCLVKDXXFPEPVTWSNNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVV
TVPRSSSIFTQTYICHVNWKPSNTKVDKXVEPKSCDKTKHTCPPCPAPEELGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKNNYVDGVEVEMAKTKPREEQVASTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYRKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSILTCVKGFTYPSDIA
VWEVESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLISKLTVDKSRWQQGNVIFSCSVMEGLHHHYTOKSLS
LSPGK

Figura 8

TF1

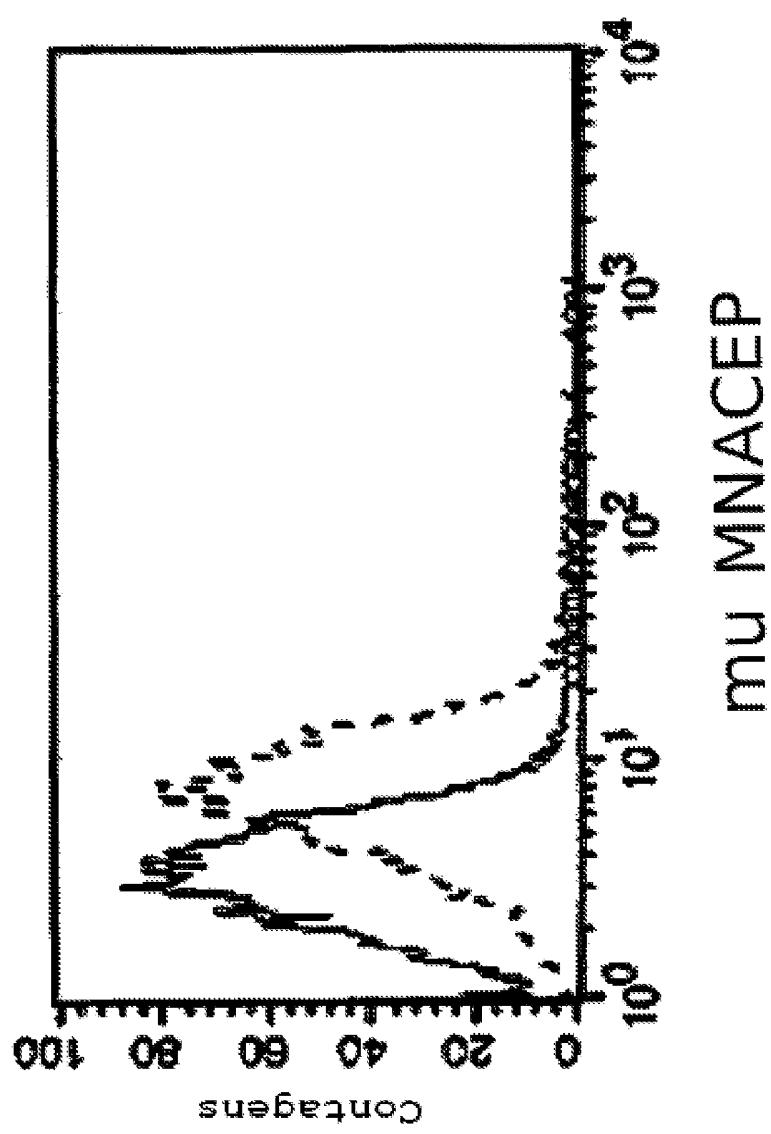


Figura 8 (continuação)

TF1

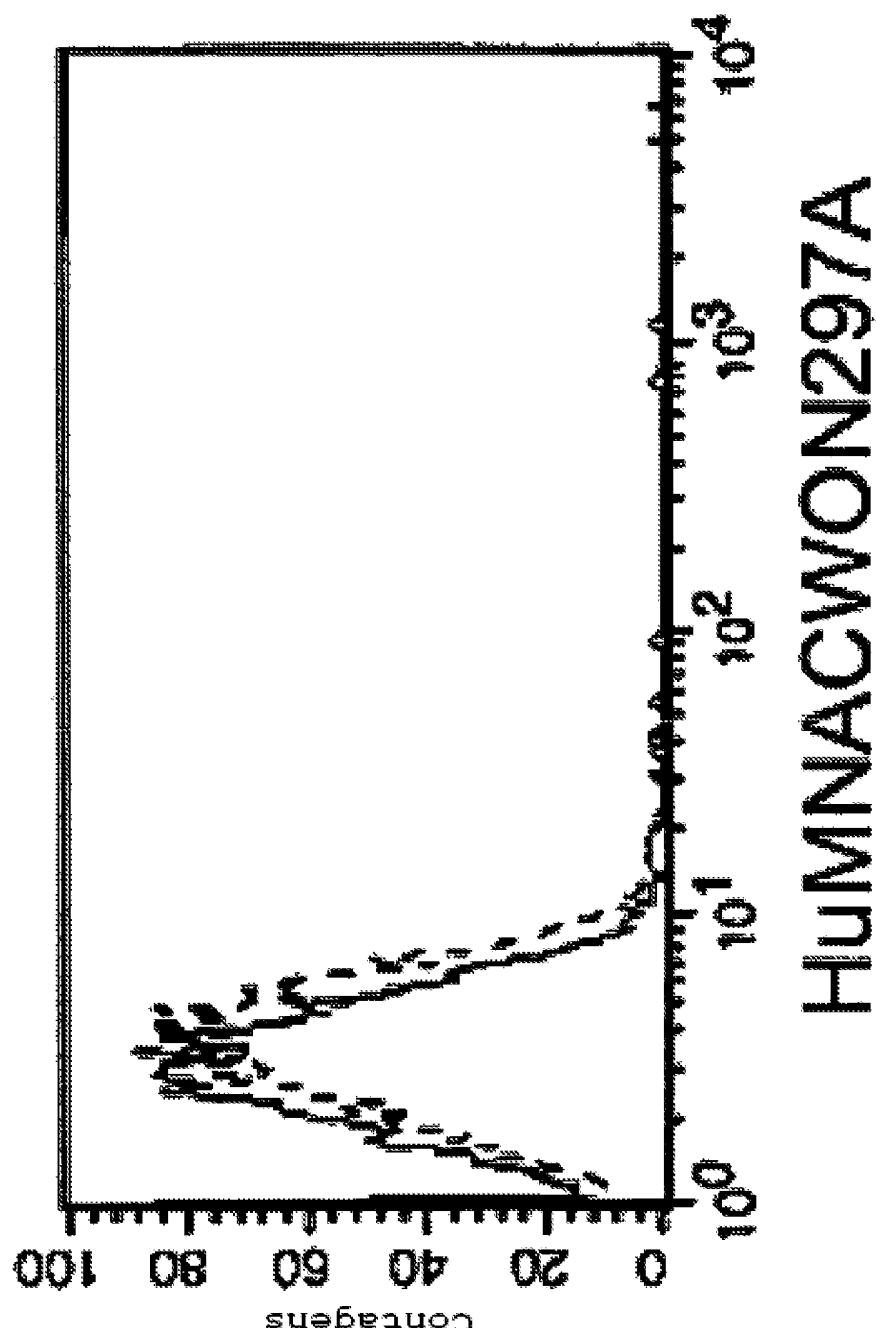


Figura 8 (continuação)

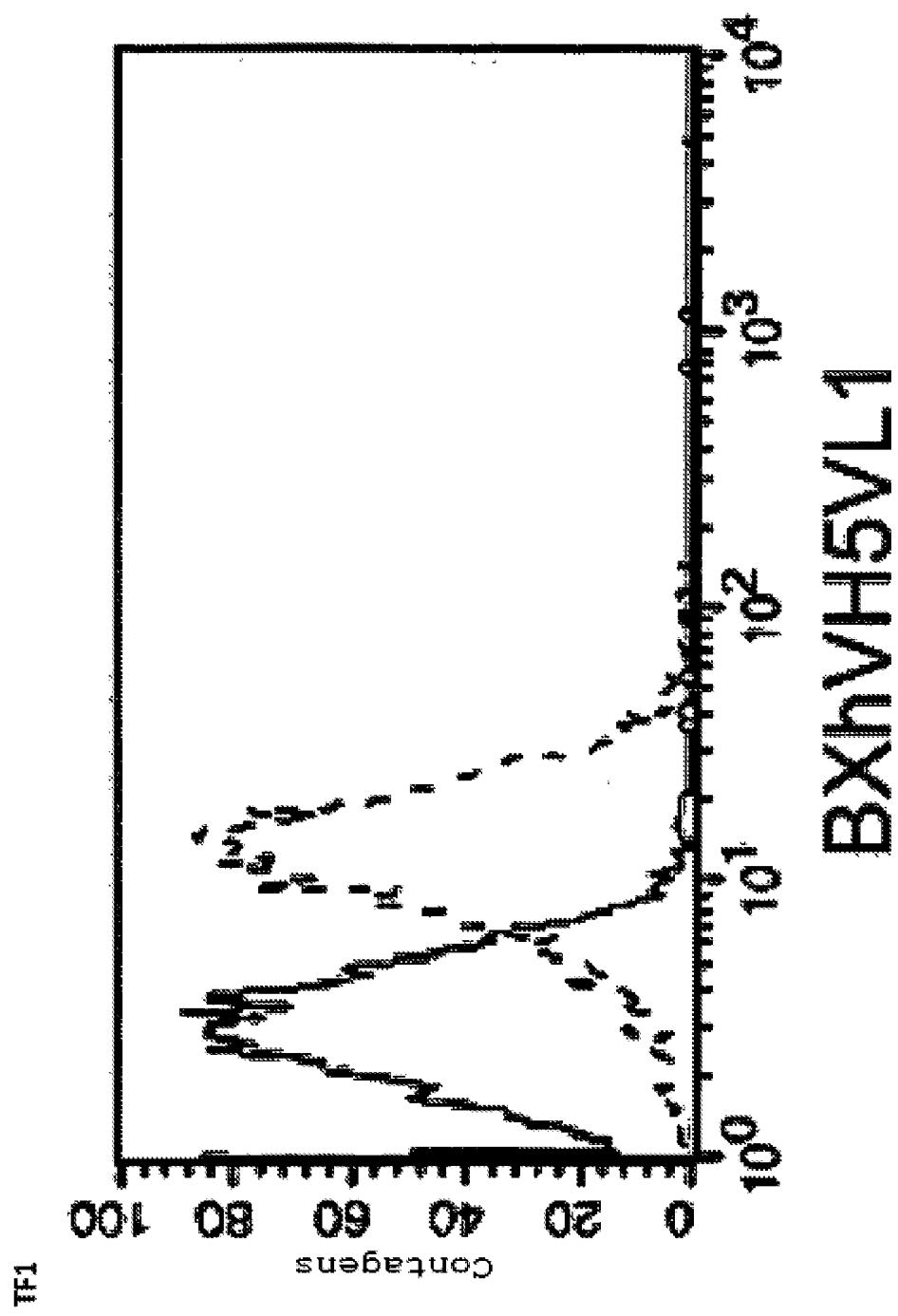


Figura 8 (continuação)

TF1

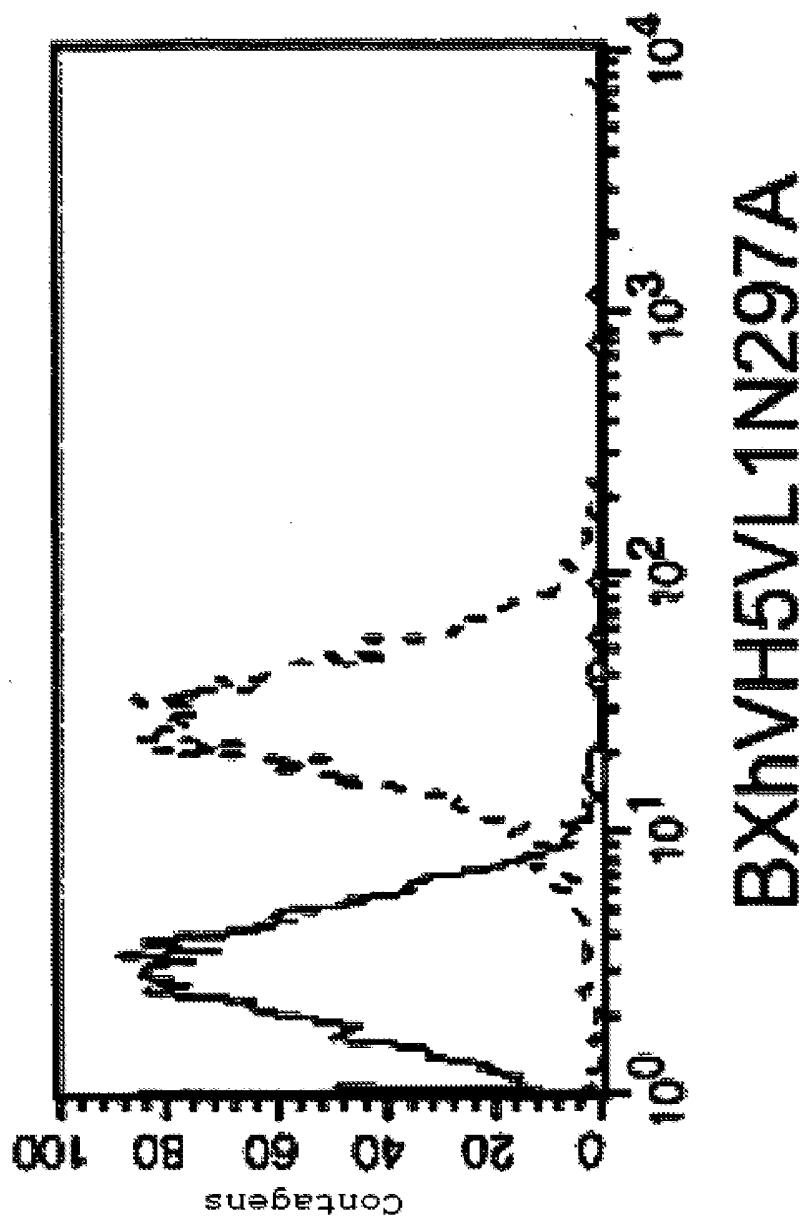


Figura 8 (continuação)

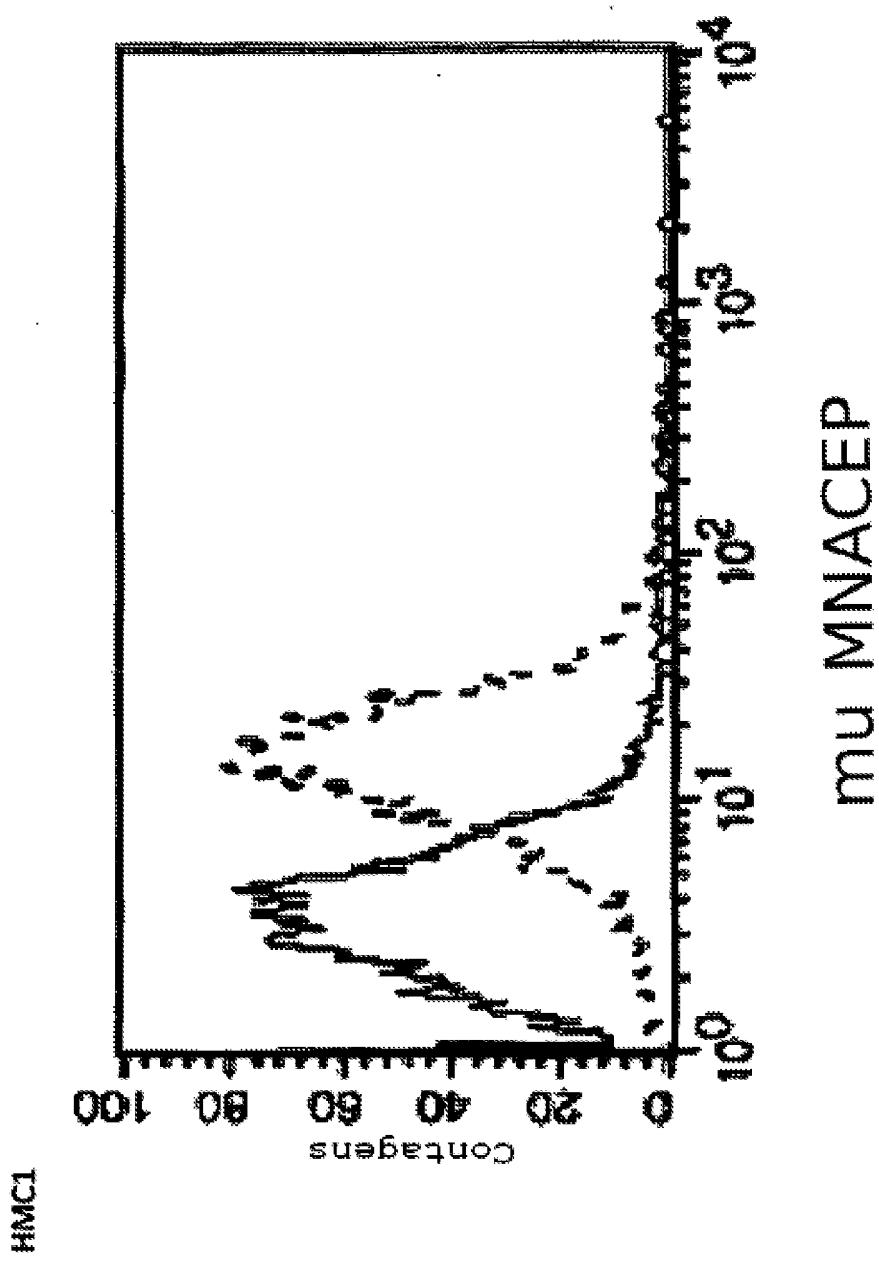


Figura 8 (continuação)

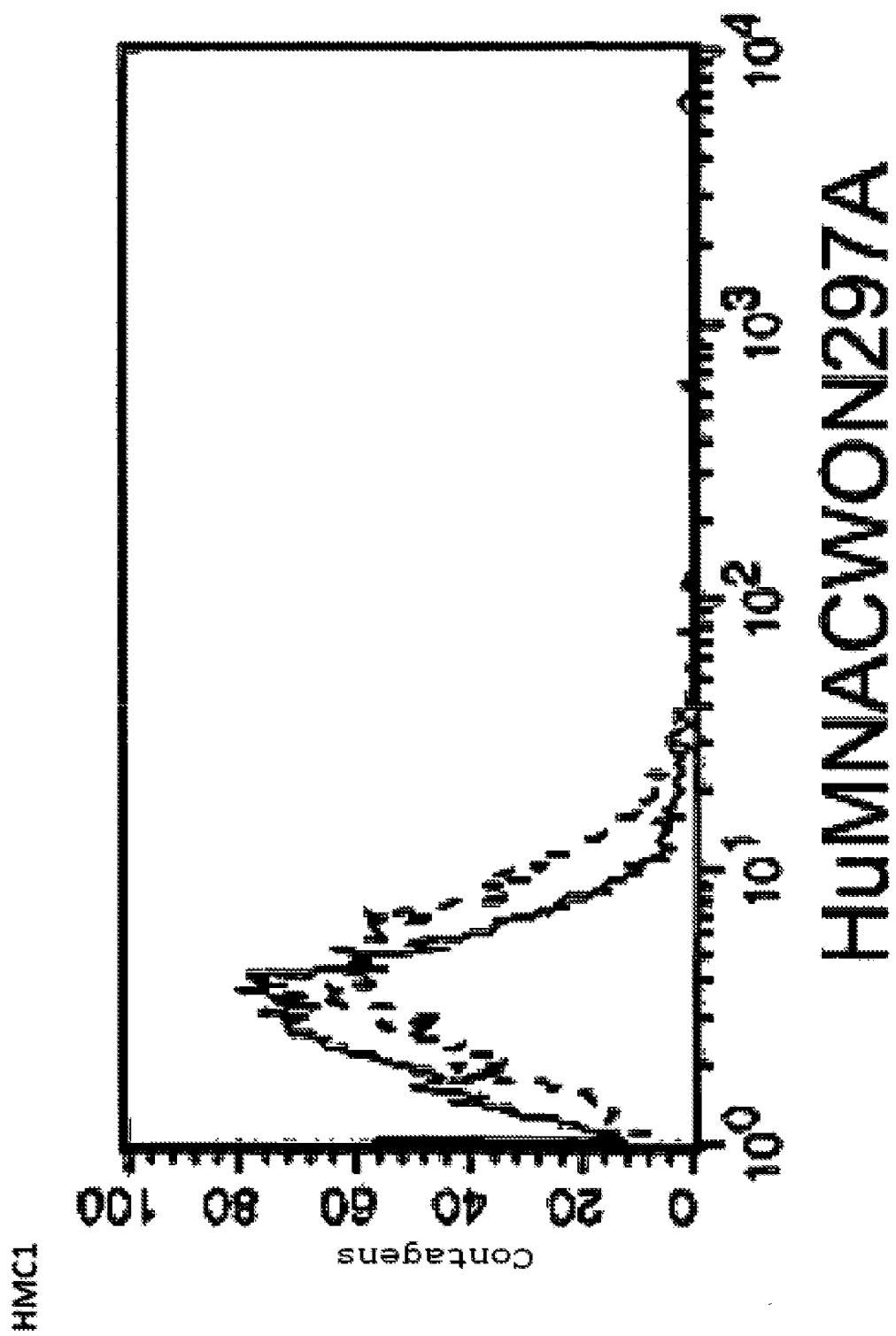


Figura 8 (continuação)

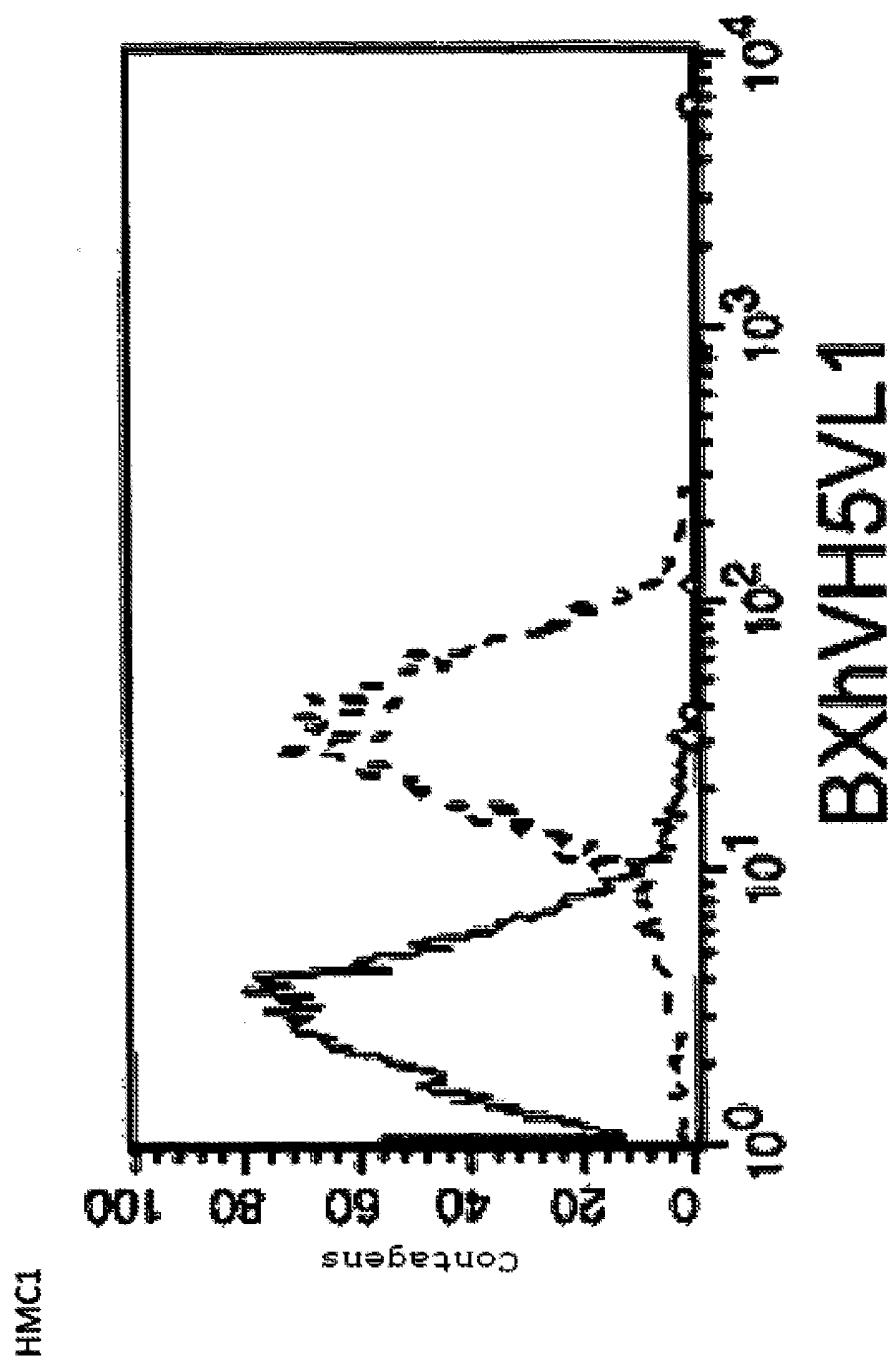


Figura 8 (continuação)

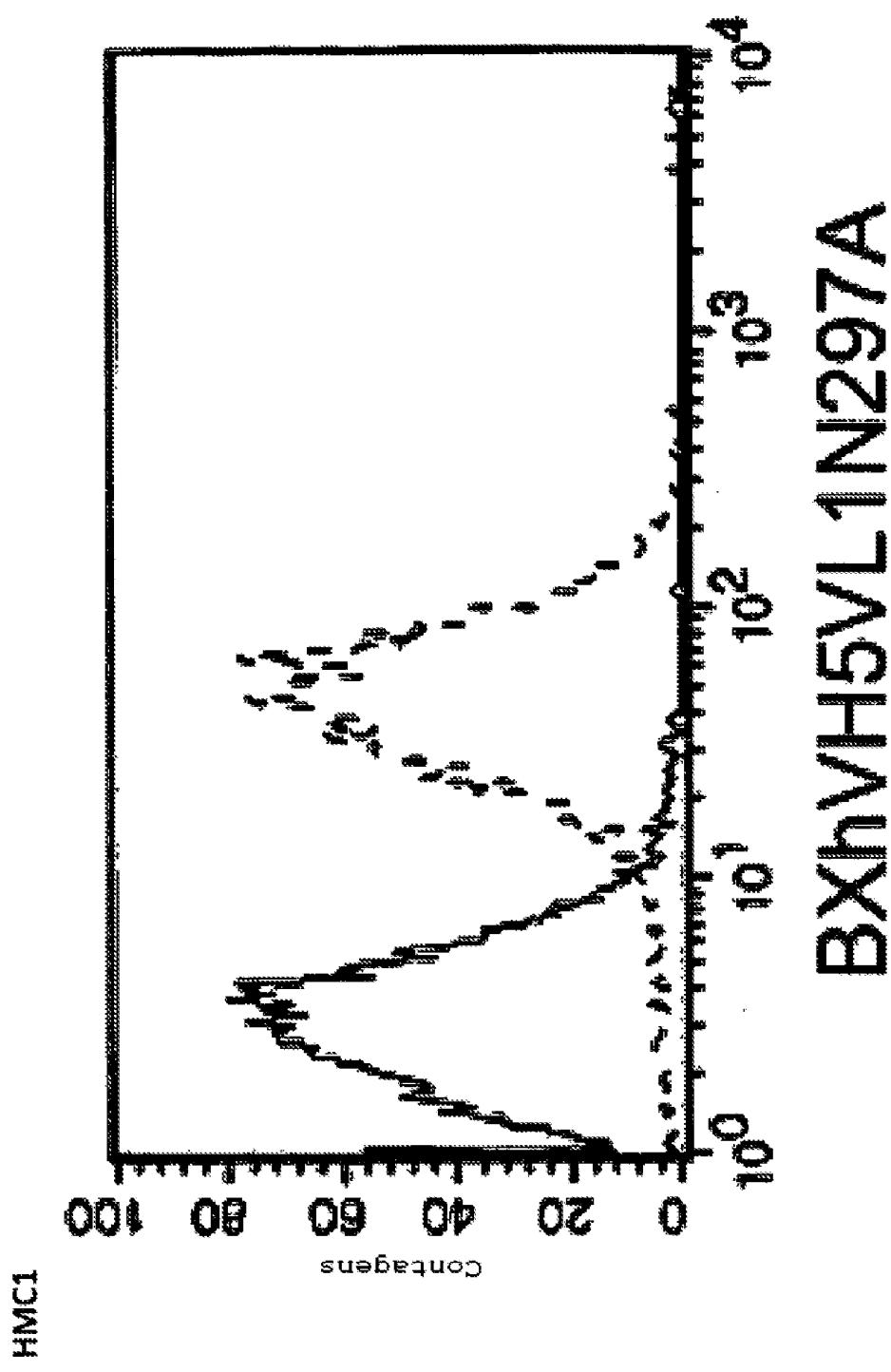


Figura 8 (continuação)

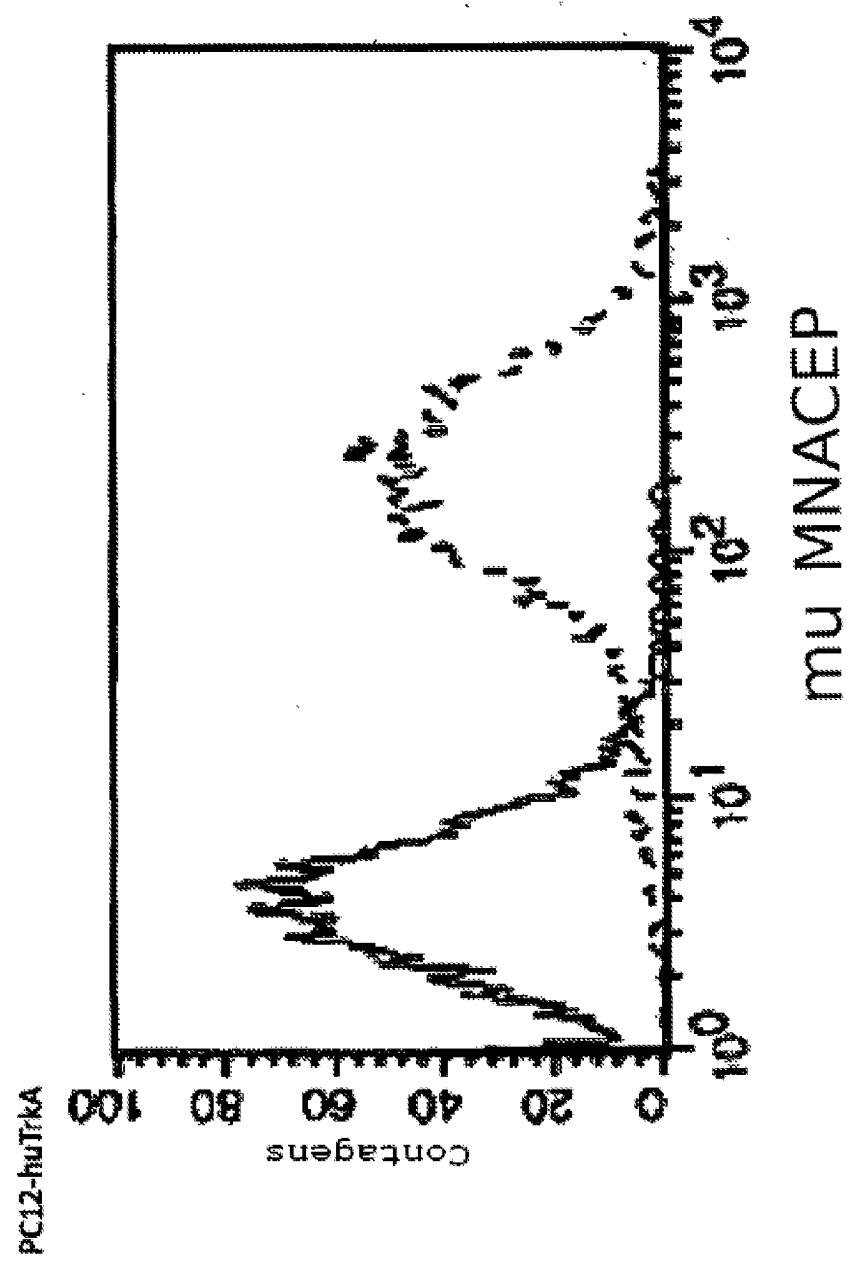


Figura 8 (continuação)

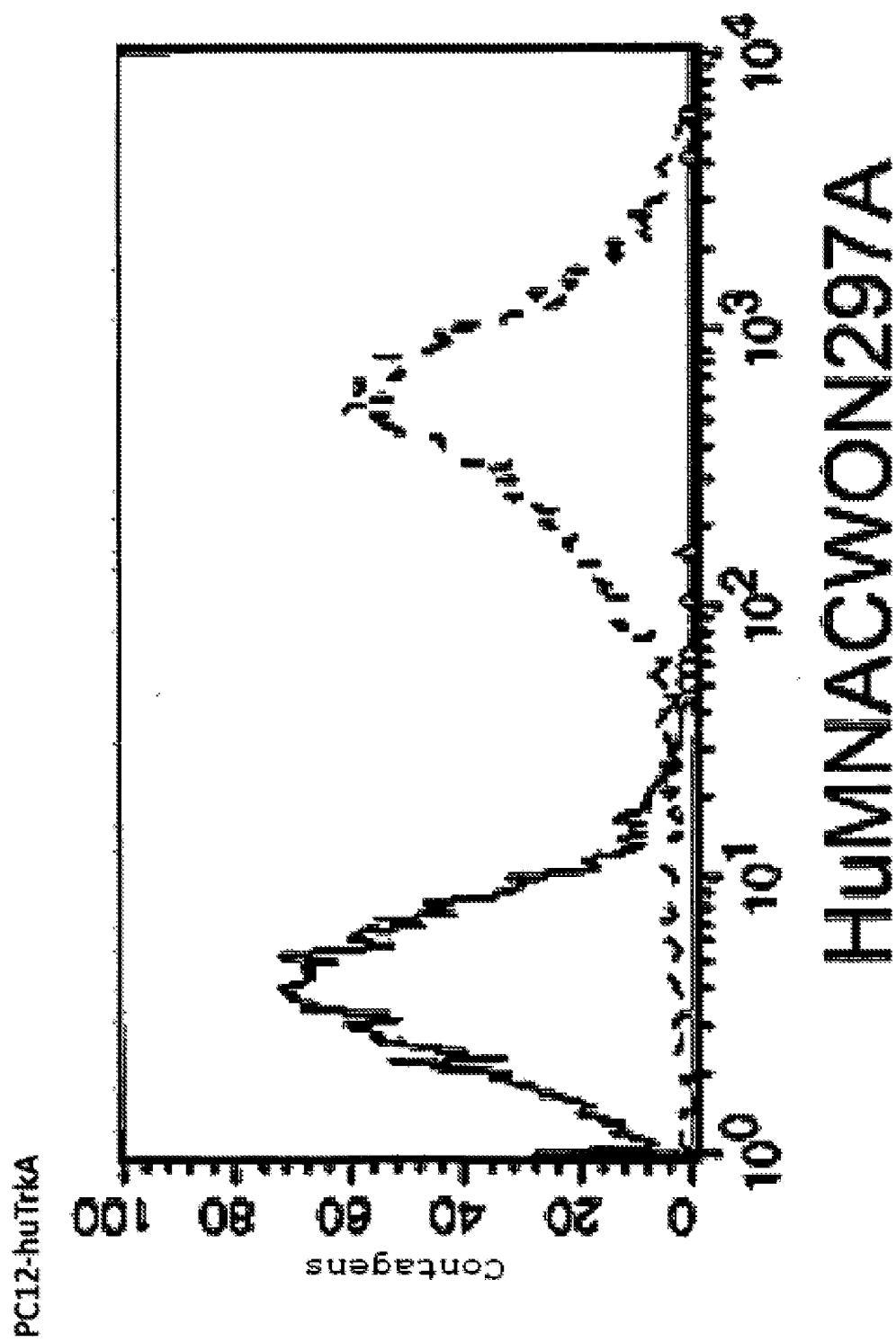


Figura 8 (continuação)

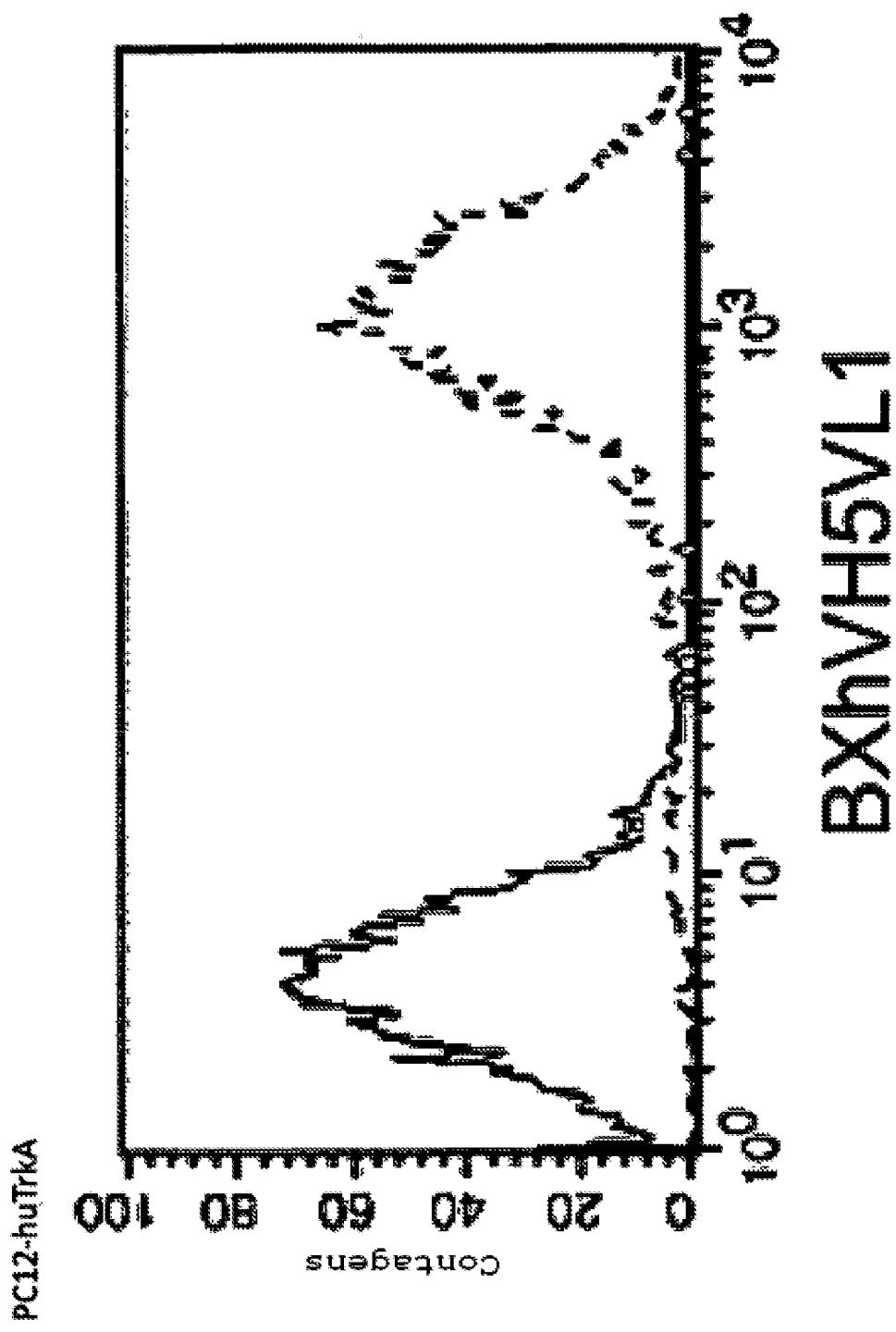


Figura 8 (continuação)

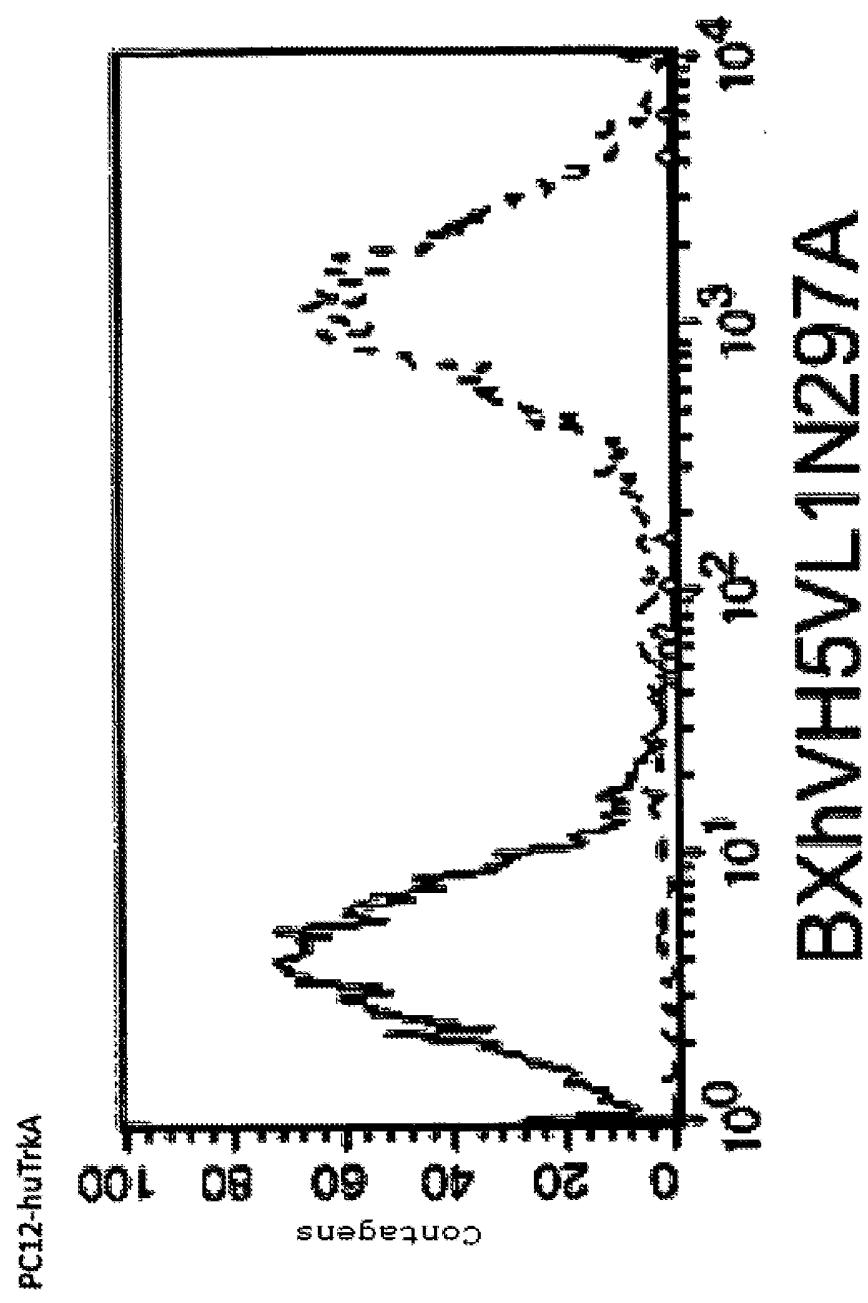


Figura 9

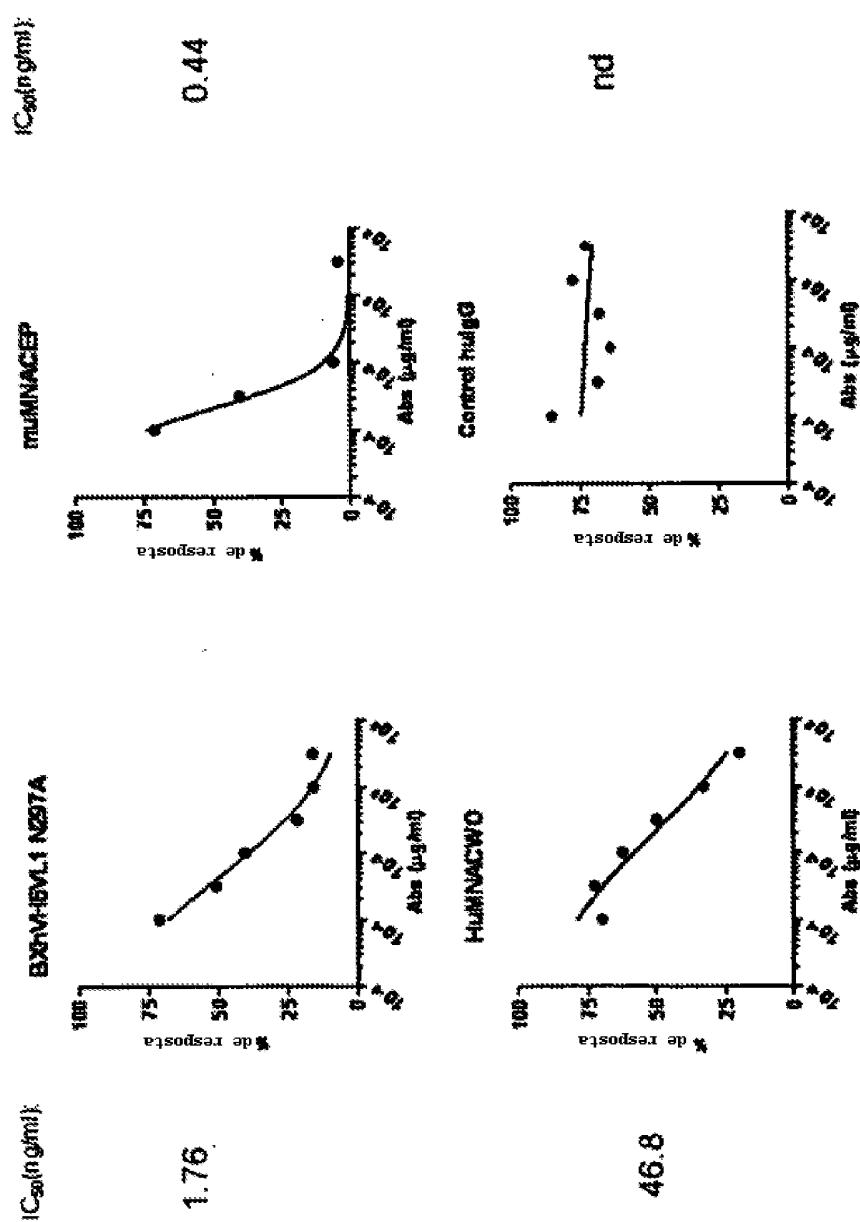


Figura 10

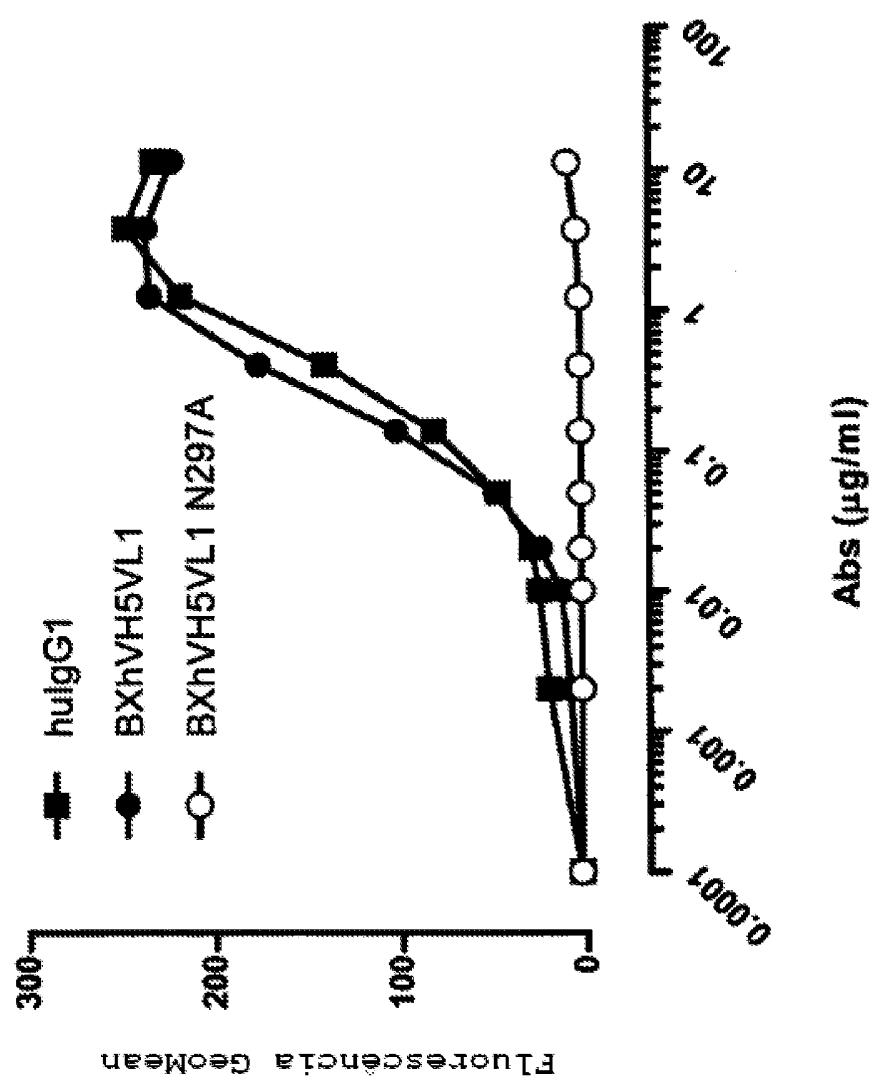


Figura 11

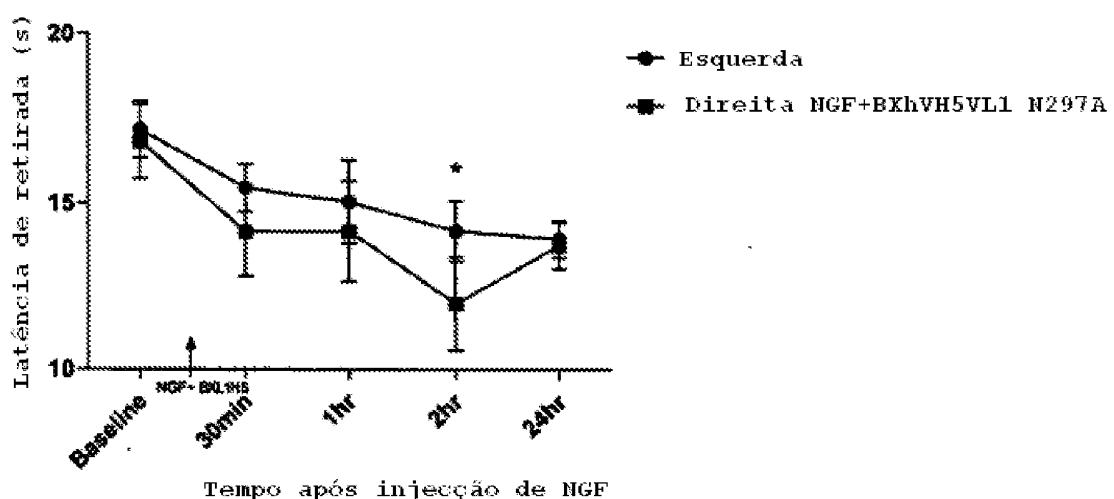
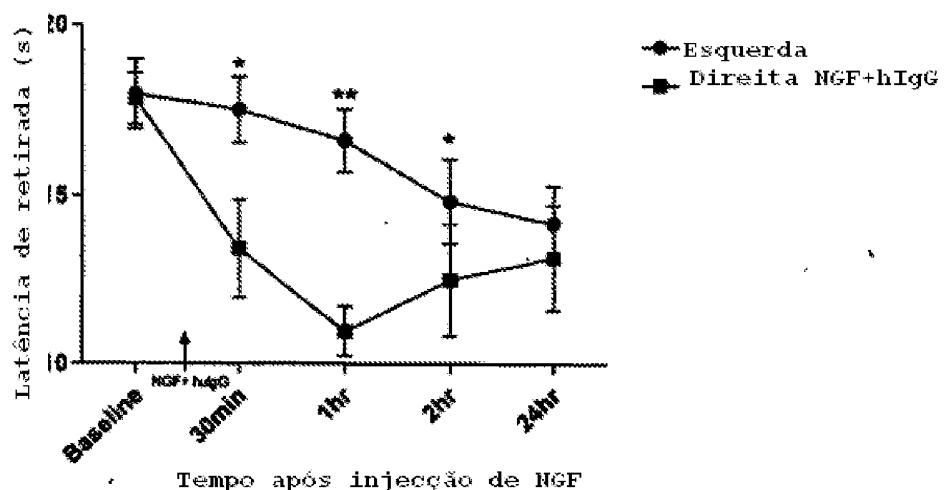
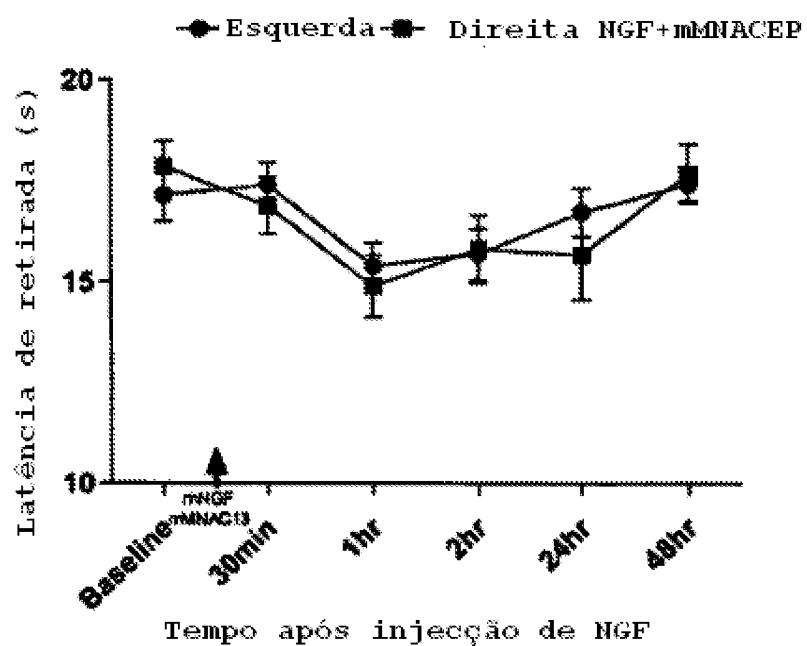
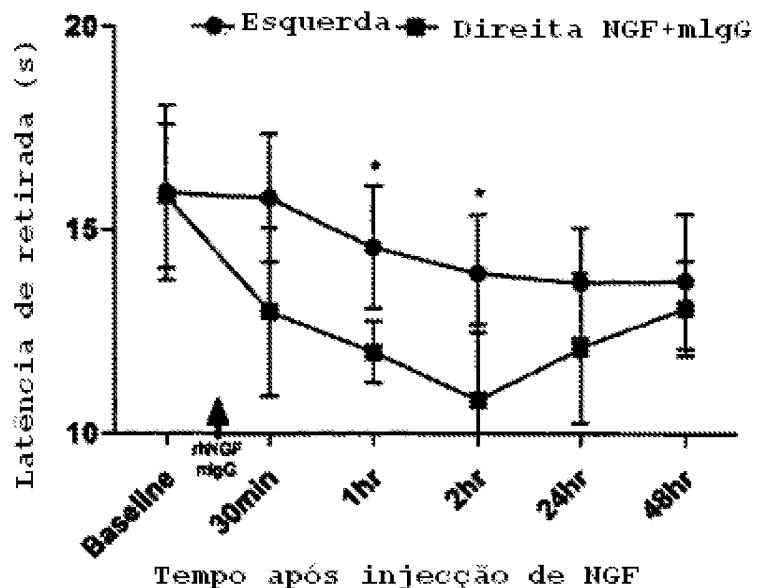
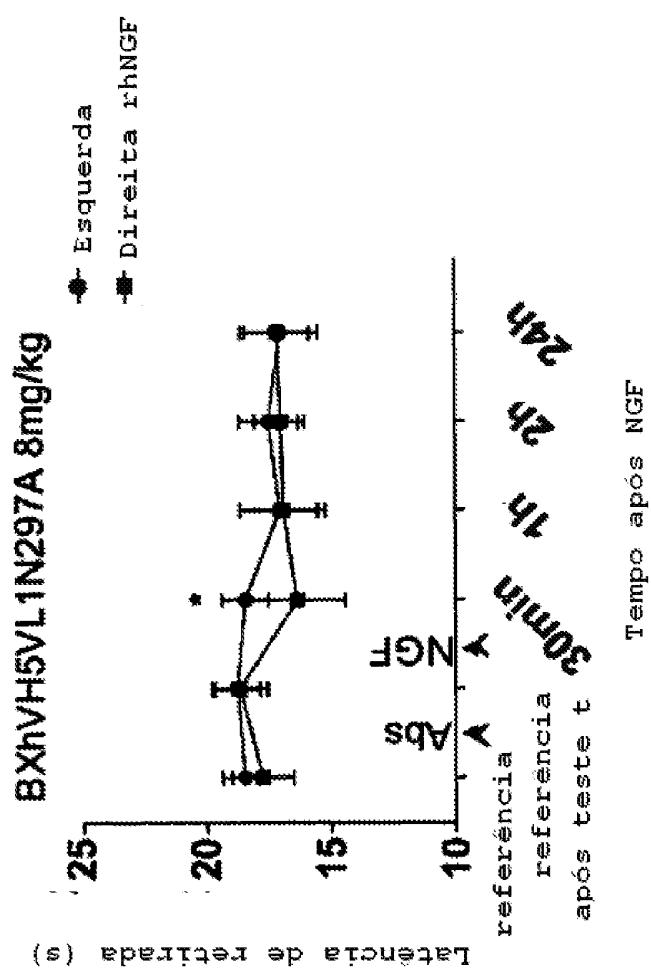


Figura 12





- * p<0.05 teste T emparelhado vs pata direita
- ** p<0.01 teste T emparelhado vs pata direita
- † p<0.05 teste T emparelhado vs referência

Figura 13

Figura 13 (continuação)

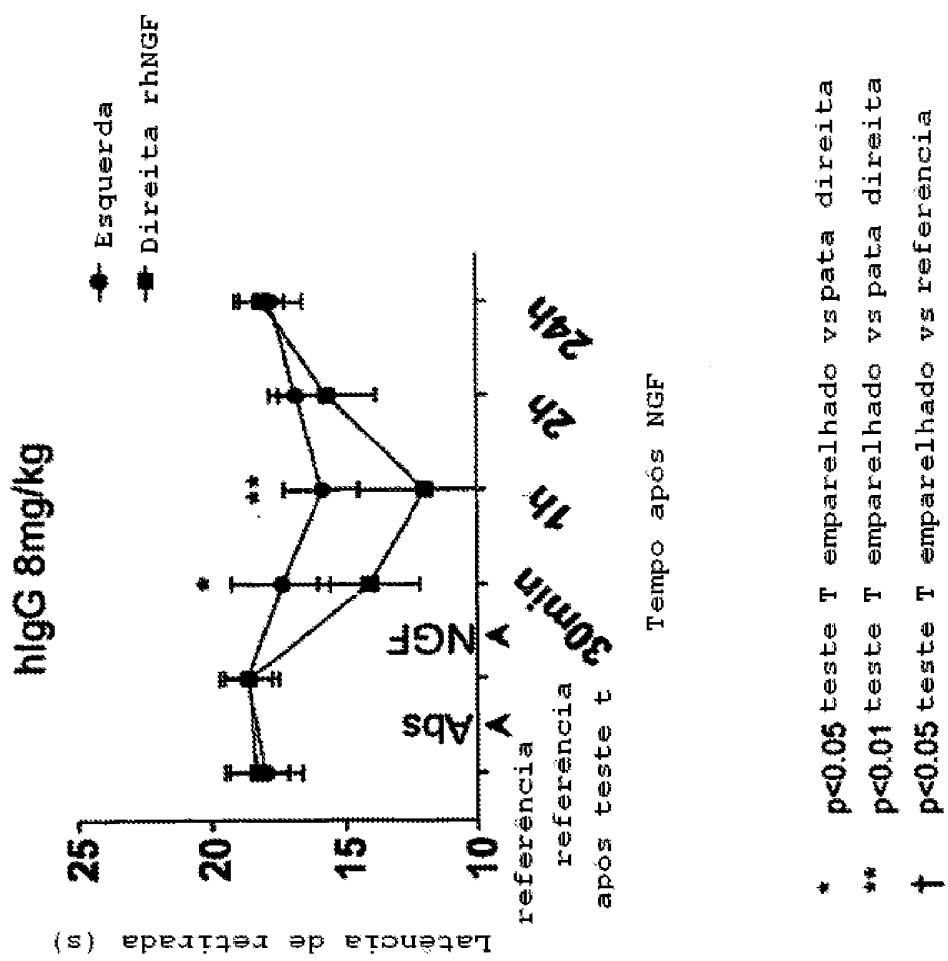


Figura 13 (continuação)

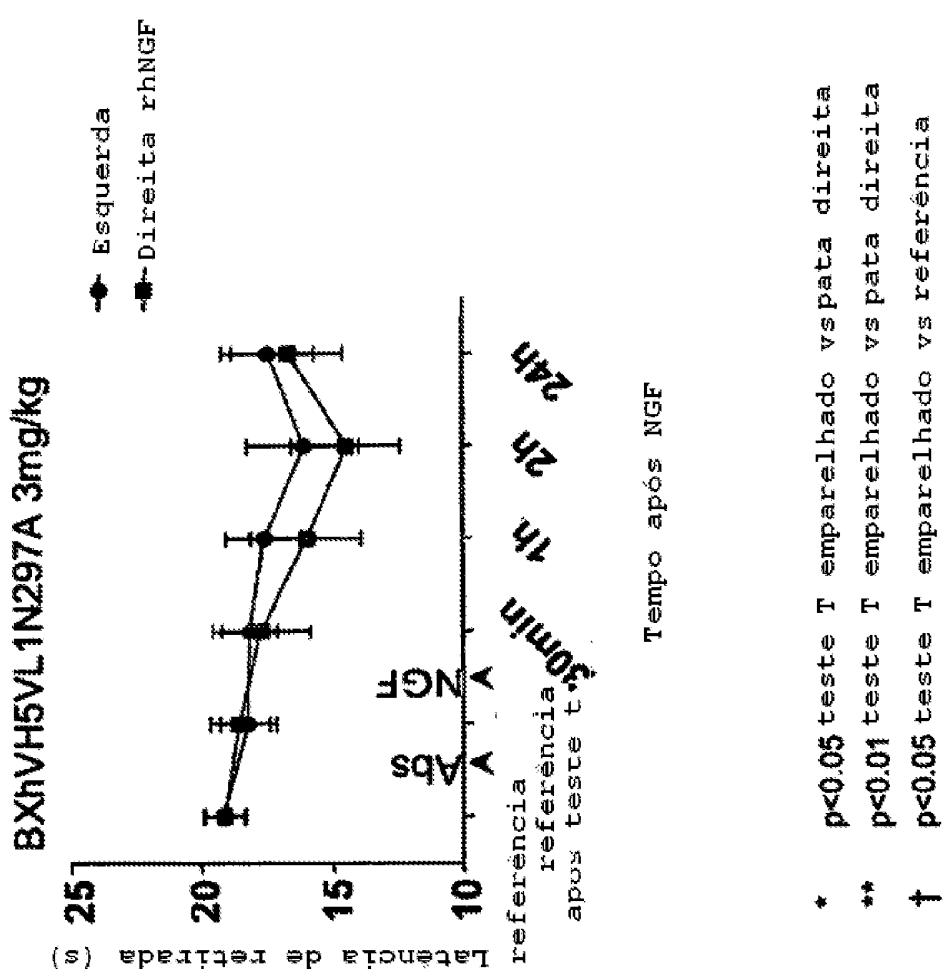


Figura 13 (continuação)

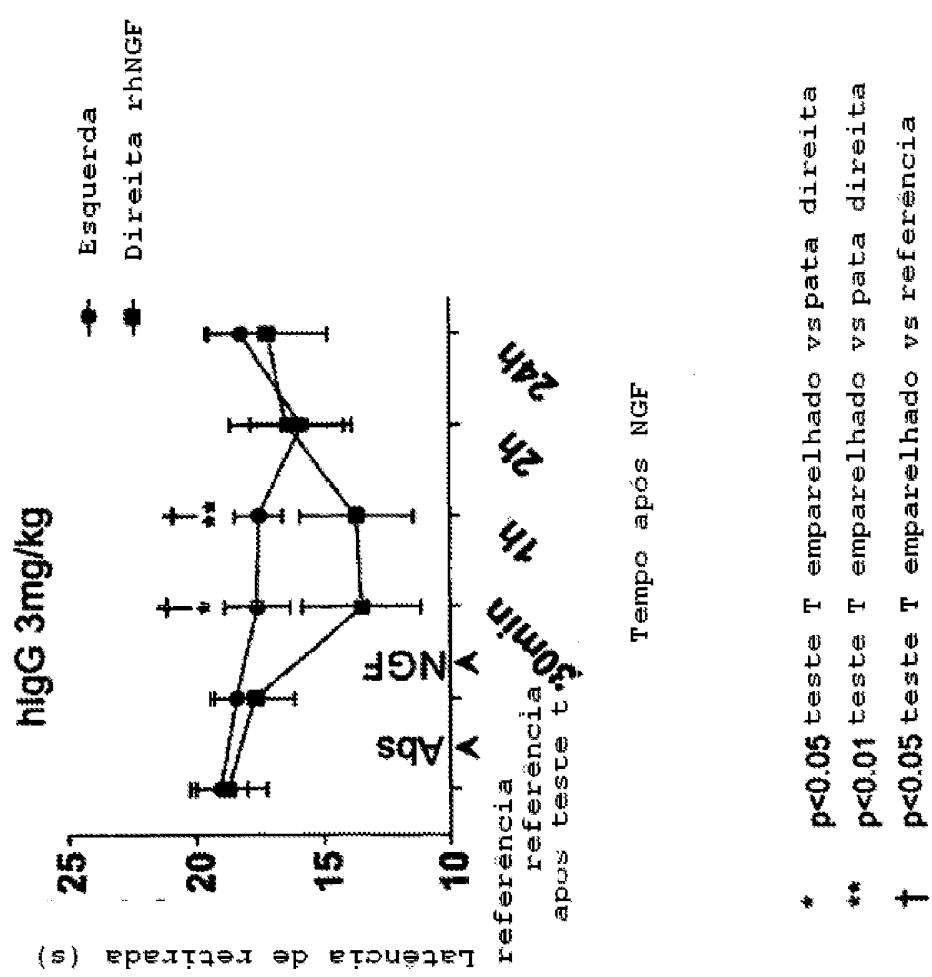


Figura 13 (continuação)

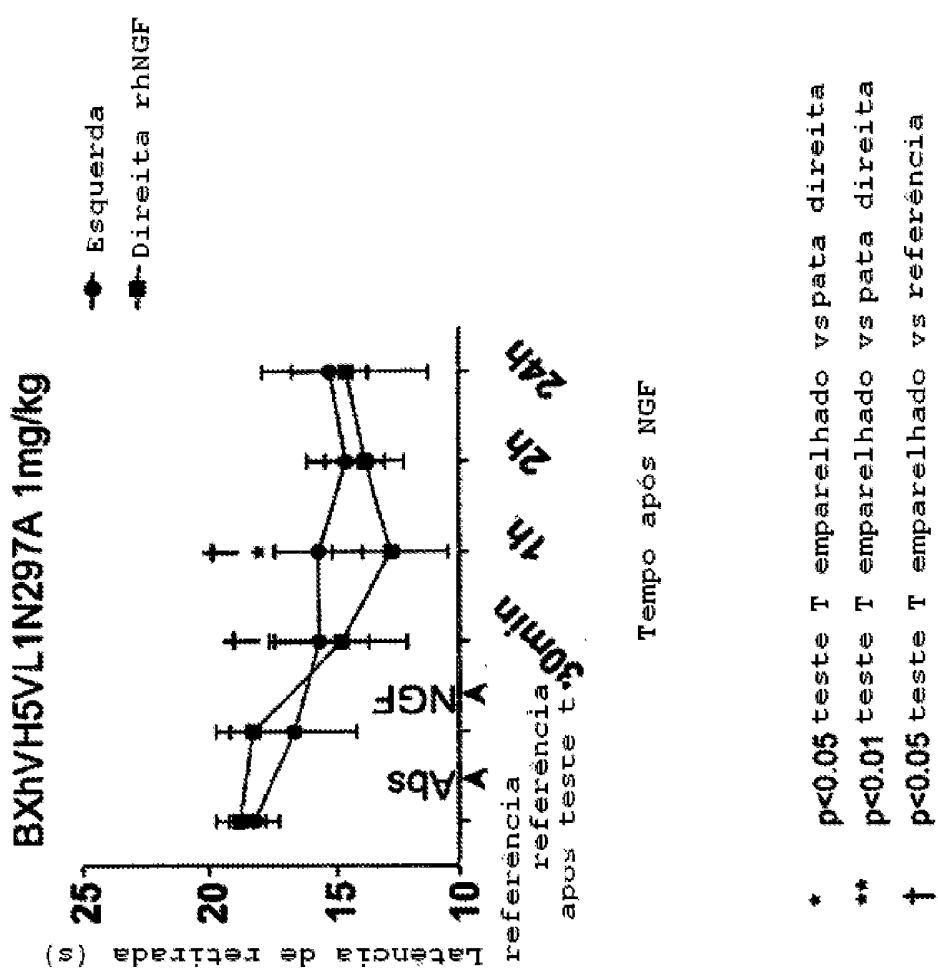


Figura 13 (continuação)

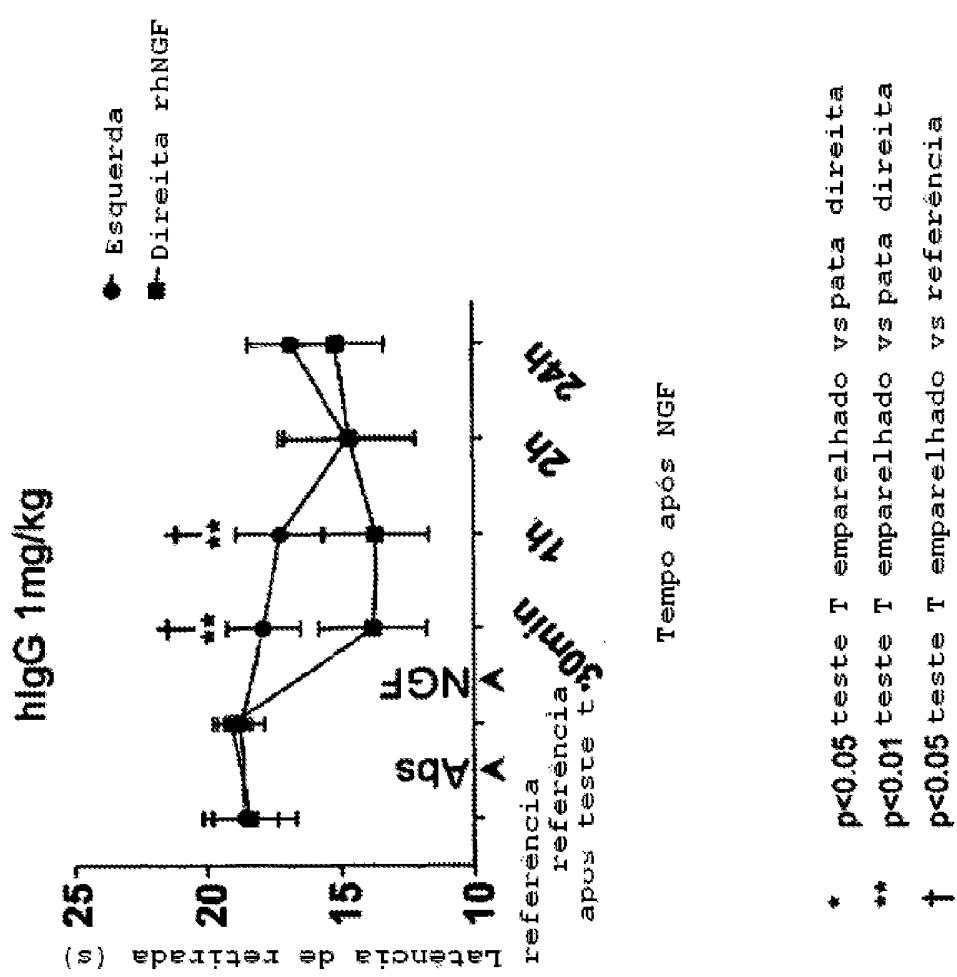


Figura 14

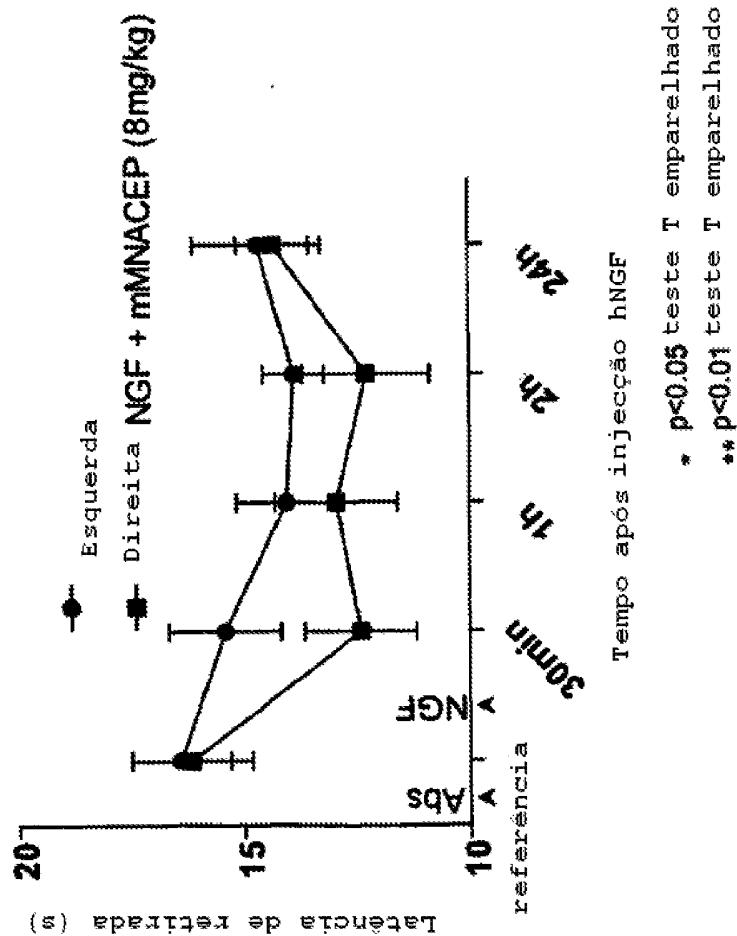


Figura 14 (continuação)

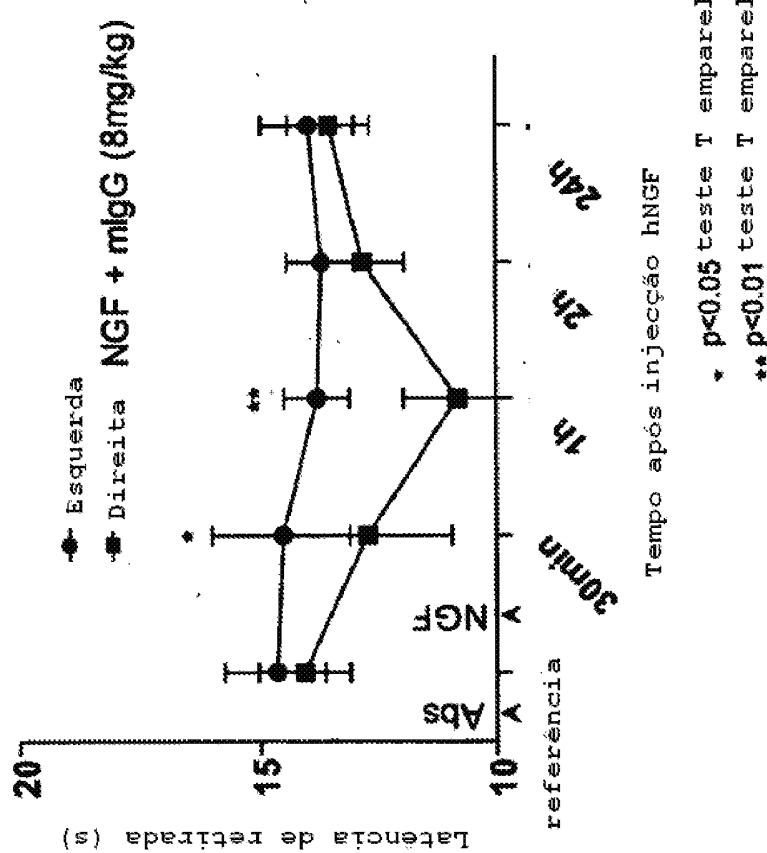


Figura 14 (continuação)

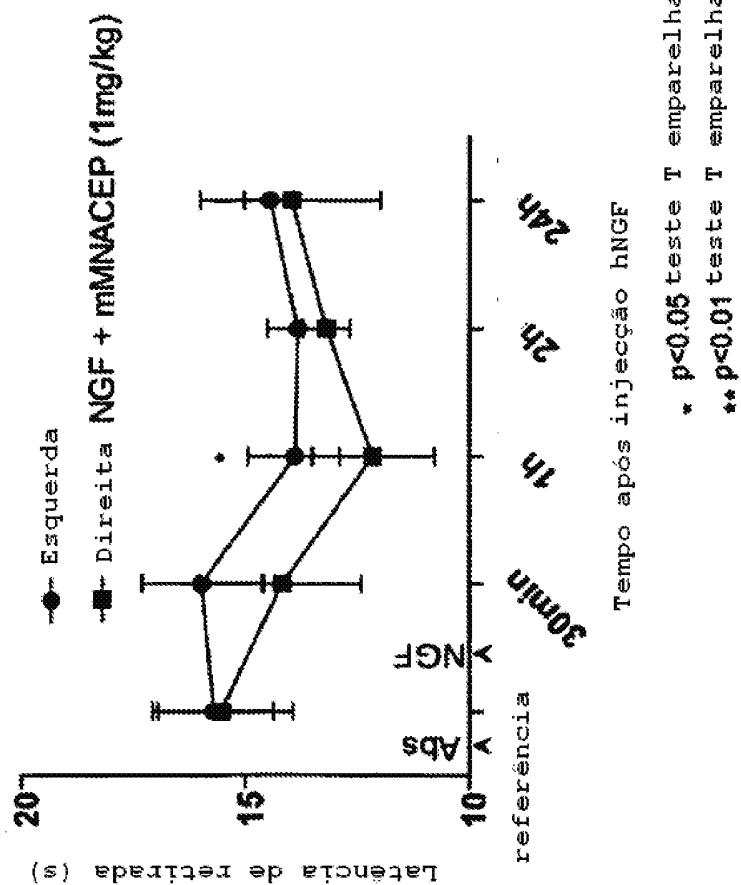


Figura 14 (continuação)

