República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0610463-0 A2**

* B R P I 0 6 1 0 4 6 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 11/04/2006
(43) Data da Publicação: 22/06/2010
(RPI 2059)

(51) Int.Cl.:
A61K 39/395
A61P 19/02
A61P 29/02
C07K 16/22

(54) Título: **USOS DE UM ANTAGONISTA DE NGF E KITS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO O MESMO**

(30) Prioridade Unionista: 11/04/2005 US 11/104,248

(73) Titular(es): RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION

(72) Inventor(es): ARNON ROSENTHAL, DAVID L. SHELTON, PATRICIA ANN WALICKE

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006013921 de 11/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/110883de 19/10/2006

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a anticorpos anti-NGF (tais como anticorpos anti-NGF antagonistas), e polinucleotídeos codificando os mesmos. A invenção adicionalmente refere-se ao uso de semelhantes anticorpos e/ou polinucleotídeos no tratamento e/ou prevenção de dor, inclusive dor pós-cirúrgica, dor da artrite reumatóide, e dor de osteoartrite.

Ret 020070174543
Pi 0610463-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS PARA TRATAR DOR DE OSTEOARTRITE ADMINISTRANDO UM ANTAGONISTA DE FATOR DE CRESCIMENTO NERVOSO E COMPOSIÇÕES CONTENDO O MESMO".**

REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício de prioridade do pedido de patente dos Estados Unidos Serial No. 11/104.248, arquivado em 11 de abrila de 2005, o qual é incorporado aqui, a este pedido de patente, por meio de referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presnete invenção refere-se a anticorpos anti-NGF (tais como anticorpos antagonistas anti-NGF). A invenção adicionalmente refere-se ao uso de antagonistas tais como anticorpos no tratamento e/ou prevenção de dor, inclusive dor pós-cirúrgica, dor da artrite reumatóide, e dor de osteoartrite.

ANTECENTES DA INVENÇÃO

O fator de crescimento nervoso (NGF) foi a primeira neurotrofina a ser identificada, e sua função no desenvolvimento e sobrevida tanto dos neurônios periféricos quanto centrais foi bem caracterizado. Foi demonstrado que o NGF é um fator crucial de sobrevida e manutenção no desenvolvimento de neurônios periféricos simpáticos e embrionários sensoriais e de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal. Smeyne et al., *Nature* 368:246-249 (1994) e Crowley et al., *Cell* 76:1001-1011 (1994). O fator de crescimento nervoso regula para cima a expressão de neuropeptídeos em neurônios sensoriais (Lindsay and Harmer, *Nature* 337:362-364 (1989)) e sua atividade é mediada através de dois receptores ligados a membrana diferentes, o receptor de tirosina quinase TrkA e o receptor de neurotrofina comum p75 (algumas denominados receptores de NGF "de alta afinidade" e "de baixa afinidade", respectivamente). Chao et al., *Science* 232:518-521 (1986). O receptor p75 é estruturalmente relacionado o outros membros da família de receptores do fator de necrose tumoral (Chao, et al., *Science* 232:518-521 (1986)). Para revisão sobre NGF, veja Huang et al., *Annu. Rev.*

Neurosci. 24:677-736 (2001); Bibel et al., *Genes Dev.* 14:2919-2937 (2000). Foi determinada a estrutura cristalina de NGF e NGF em complexo com o receptor trkA. Veja *Nature* 254:411 (1991); *Nature* 401:184-188 (1996).

Além de seus efeitos no sistema nervoso, o NGF tem sido crescentemente implicado em processos fora do sistema nervoso. Por exemplo, foi mostrado que NGF reforça a permeabilidade vascular (Otten, et al., *Eur J Pharmacol.* 106:199-201 (1984)), reforça as reações imunes de células T e B (Otten, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 86:10059-10063 (1989)), induz diferenciação de linfócitos e proliferação de mastócitos e causa a liberção de sinais biológicos solúveis de mastócitos (Matsuda, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 85:6508-6512 (1988); Pearce, et al., *J. Physiol.* 372:379-393 (1986); Bischoff, et al., *Blood* 79:2662-2669 (1992); Horigome, et al., *J. Biol. Chem.* 268:14881-14887 (1993)). Embora tenha sido mostrado que NGF adicionado exogenamente tem a capacidade de ter todos estes efeitos, é importante notar que somente raramente foi mostrado que NGF endógeno é importante em quaisquer destes processos *in vivo* (Torcia, et al., *Cell.* 85(3):345-56 (1996)). Portanto, não está claro qual este efeito pode ser, se houver, para inibir a bioatividade do NGF endógeno.

NGF é produzido por uma série de tipos celulares inclusive mastócitos (Leon, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 91:3739-3743 (1994)), linfócitos B (Torcia, et al., *Cell* 85:345-356 (1996), queratinócitos (Di Marco, et al., *J. Biol. Chem.* 268:22838-22846)), células musculares lisas (Ueyama, et al., *J. Hypertens.* 11:1061-1065 (1993)), fibroblastos (Lindholm, et al., *Eur. J. Neurosci.* 2:795-801 (1990)), células epiteliais bronquiais (Kassel, et al., *Clin, Exp. Allergy* 31:1432-40 (2001)), células mesangiais renais (Steiner, et al., *Am. J. Physiol.* 261:F792-798 (1991)) e miotubos dos músculos esqueléticos (Schwartz, et al., *J Photochem. Photobiol.* B66:195-200 (2002)). Foram encontrados receptores de NGF em uma variedade de tipos celulares fora do sistema nervoso. Por exemplo, TrkA foi encontrado em monócitos humanos, linfócitos T e B e em mastócitos.

Foi observada uma associação entre aumento dos níveis de NGF e uma variedade de condições inflamatórias em pacientes humanos

bem como em vários modelos animais. Estes incluem lúpus eritematoso sistêmico (Bracci-Laudiero, et al., *Neuroreport* 4:563-565 (1993)), esclerose múltipla (Bracci-Laudiero, et al., *Neurosci. Lett.* 147:9-12 (1992)), psoríase (Raychaudhuri, et al., *Acta* Derm. l'enereol. 78:84-86 (1998)), artrite (Falcim, et al., Ann. Rheum. Dis. 55:745-748 (1996)), cistite intersticial (Okragly, et al., J. Urology 161:438-441 (1999)) e asma (Braun, et al., Eur. J Immunol. 28:3240-3251 (1998)).

Consistentemente, um nível elevado de NGF nos tecidos periféricos está associado a hiperalgesia e inflamação e foi observado em uma série de formas de artrite. A sinóvia dos pacientes afetados por artrite reumatóide expressa altos níveis de NGF ao passo que foi reportado que é indetectável NGF em sinóvia não inflamada (Aloe, et al., Arch. Rheum. 35:351-355 (1992)). Foram vistos resultados semelhantes em ratos com artrite reumatóide induzida experimentalmente (Aloe, et al., Clin. Exp. Rheumatol. 10:203-204 (1992)). Foram reportados níveis elevados de NGF em camundongos artríticos transgênicos junto com um aumento no número de mastócitos (Aloe, el al., Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects 15:139-143 (1993)). Publicação de Patente Internacional No. WO 02/096458 descreve o uso de anticorpos anti-NGF de algumas propriedades no tratamento de vários distúrbios relacionados com o NGF tais como condição inflamatória (por exemplo, artrite reumatóide). Foi reportado que um anticorpo anti-NGF purificado injetado em camundongos artríticos transgênicos carregando o gene do fator-α de necrose tumoral humana (TNF-α) causou redução no número de mastócitos, bem como uma redução nos níveis de histamina e substância P dentro da sinóvia de camundongos com artrite (Aloe et al., Rheumatol. Int. 14: 249-252 (1995)). Foi mostrado que a administração exógena de um anticorpo contra NGF reduziuo aumento do nível de TNF-α ocorrendo em camundongos artríticos (Manni et al., Rheumatol. Int. 18: 97-102 (1998)).

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

Foram reportados anticorpos antagonistas anti-NGF de roedo-

res. Veja, por exemplo, Hongo et al, Hybridoma (2000) 19(3):215-227; Ruberti et Al. (1993) Cell. Molec. Neurobiol. 13(5): 559-568. No entanto, quando anticorpos de roedores são usados terapeuticamente em seres humanos, desenvolve-se uma reação de anticorpo antimurino humano em números significativos de indivíduos tratados. Além disso, funções efetoras de anticorpos de camundongo se comprovaram menos eficientes no contexto humano. Portanto, existe uma séria necessidade de anticorpos antagonistas anti-NGF, inclusive anticorpos antagonistas anti-NGF humanizados.

Todas as referências, publicações, e pedidos de patente descritos aqui, são por este incorporado por meio de referência em sua totalidade.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção descreve aqui, diz respeito a anticorpos contra fator de crescimento nervoso.

Em outro aspecto, a invenção é um anticorpo maturado de afinidade e humanizado, E3, o qual especificamente liga fator de crescimento nervoso humano e de roedor ("NGF"). A seqüências de aminoácidos da cadeia pesada e regiões variáveis de cadeia leve de E3 são mostradas nas Figuras 1A (SEQ ID NO: 1) e 1B (SEQ ID NO: 2), respectivamente. As porções de CDR de anticorpo E3 (inclusive CDRs de Chothia e Kabat) são representadas diagrammaticamente nas Figuras 1A e 1B. As seqüências de aminoácidos de cadeias pesada e leve E3, e das CDRs individuais estendidas também são mostradas abaixo (Veja, "seqüências de anticorpos", abaixo).

Em outro aspecto, a invenção é um anticorpo compreendendo um fragmento ou uma região do anticorpo E3 (denominado de modo intercambiável "E3" aqui). Em uma modalidade, o fragmento é uma cadeia leve do anticorpo E3 conforme mostrado na Figura 1B. Em outra modalidade, o fragmento é uma cadeia pesada do anticorpo E3 conforme mostrado na Figura 1A. Em ainda outra modalidade, o fragmento contém uma ou mais regiões variáveis de uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada do anticorpo E3. Em ainda outra modalidade, o fragmento contém uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de uma cadeia leve e/ou uma

cadeia pesada do anticorpo E3 conforme mostrado na Figura 1A e 1B.

Em outro aspecto, a invenção é um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que é codificada por um polinucleotídeo que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC No. PTA-4893 ou ATCC No. PTA-4894. Em outro aspecto, a invenção é um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleotídeo que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895. Em outro aspecto, a invenção é um anticorpo compreendendo (a) uma cadeia leve que é codificada por um polinucleotídeo que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC No. PTA-4894 o ATCC No. PTA-4893; e (b) uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleotídeo que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895 (por conveniência aqui, o um ou mais polinucleotídeos produzidos por uma célula hospedeira depositada são referidos como tendo um número de depósito de ATCC NOs PTA-4894, PTA-4893 e PTA-4895). Em outro aspecto, a invenção é um anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia leve de uma cadeia leve que é codificada por um polinucleotídeo que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC No. PTA-4894 ou ATCC No. PTA-4893. Em outro aspecto, a invenção é um anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada de uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleotídeo que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895. Em outro aspecto, a invenção é um anticorpo compreendendo (a) uma região variável de cadeia leve de uma cadeia leve que é codificada por um polinucleotídeo que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC No. PTA-4894 ou ATCC No. PTA-4893, e (b) uma região variável de cadeia pesada de uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleotídeo que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895. Em ainda outro aspecto, a invenção é um anticorpo compreendendo uma ou mais CDRs codificadas por (a) um polinucleotídeo que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC

No. PTA-4894; e/ou (b) uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleotídeo que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895.

Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a região constante de IgG2a de cadeia pesada humana. Em algumas modalidades o anticorpo compreende a região constante capa de cadeia leve humana. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante modificada, tal como uma região constante que é imunologicamente inerte, por exemplo, não dispara lise mediada por complemento, ou não estimula citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependentea (ADCC). Em outras modalidades, a região constante é modificada conforme descrito em *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624; Pedido de Patente No. PCT/GB99/01441; e/ou Pedido de Patente do Reino Unido No. 9809951.8. Em ainda outras modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de IgG2a de cadeia pesada humana compreendendo as seguintes mutações: A330P331 a S330S331 (numeração de aminoácidos com referência à seqüência de IgG2a selvagem). *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (os quais podem ser ou não um anticorpo) compreendendo qualquer um ou mais dos seguintes: a) uma ou mais CDRs de anticorpo E3 mostrada nas Figuras 1A e 1B; b) CDR H3 da cadeia pesada de anticorpo E3 mostrada na figura 1A; c) CDR L3 da cadeia leve de anticorpo E3 mostrada na Figura 1B; d) três CDRs da cadeia leve de anticorpo E3 mostrada na Figura 1B; e) três CDRs da cadeia pesada de anticorpo E3 mostrada na Figura 1A; e f) três CDRs da cadeia leve e três CDRs da cadeia pesada, de anticorpo E3 mostrada nas Figuras 1A e 1B. A invenção proporciona adicionalmente polipeptídeos (os quais podem ser ou não um anticorpo) compreendendo qualquer um ou mais dos seguintes: a) uma ou mais (uma, duas, três, quatro, cindo, ou seis) CDRs derivadas do anticorpo E3 mostrada nas Figuras 1A e 1B; b) uma CDR derivada de CDR H3 da cadeia pesada de anticorpo E3 mostrada na Figura 1A; e/ou c) uma CDR derivada de CDR L3 da cadeia leve de anticorpo E3 mostrada na Figura 1B. Em algumas modalidades, as CDRs po-

dem ser CDRs Kabat, CDRs Chothia, ou uma combinação de CDRs Kabat e Chothia (denominadas CDRs "estendidas" ou "combinadas" aqui). Em algumas modalidades, polipeptídeos (tais como um anticorpo) ligam NGF (tal como NGF humano). Em algumas modalidades, os polipeptídeos compreendem quaisquer das configurações de CDF (inclusive combinações, variantes, e etc.) descritas aqui.

Em um aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo), os quais compreendem uma região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 9, em que I34 é S, L, V A, ou I; e N35 é substituído com N, T ou S. Por conveniência aqui, "substituído" ou "é" neste contexto ou referência a um aminoácido se refere a escolhas de um ou mais aminoácidos para uma dada posição. Conforme é claro, a substituição, ou escolha, pode ser o aminoácido representado em uma SEQ ID ou Figura.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 10, em que M50 é M, I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; e em que Y110 é Y, K, S, R ou T.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais

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

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é qualquer aminoácido; T93 é qualquer aminoácido; e em que Y96 é Y ou R.

Em um aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo), os quais compreendem uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 9, em que I34 é S, L, V A, ou I; e N35 é N, T ou S.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 10, em que M50 é M, I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma seqüência de aminoácidos

mostrada na SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; e em que Y110 é Y, K, S, R ou T.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que G98 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que G99 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma seqüência de aminoácidos

mostrada na SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é qualquer aminoácido; T93 é qualquer aminoácido; e em que Y96 é Y ou R.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como anticorpos, inclusive anticorpos humanizados) os quais compreendem uma região variável de cadeia pesada compreendendo a região CDR1 de SEQ ID NO: 9, em que I34 é S, L, V A, ou I; e N35 é N, T ou S; a região CDR2 de SEQ ID NO: 10, em que M50 é M, I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V; e a região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; em que Y110 é Y, K, S, R ou T. Em algumas modalidades, a região variável de cadeia pesada compreende a região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; em que Y110 é qualquer aminoácido. Em outras modalidades, a região variável de cadeia pesada compreende a região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que G98 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que G99 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido. Em algumas modalidades, o polipeptídeo (tal como um anticorpo) adicionalmente compreende uma região variável de cadeia leve de anticorpo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma região variável de cadeia leve compreendendo a região CDR1 de SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q; a região CDR2 de SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T; e a região CDR3 de SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas modalidades, a região variável de cadeia leve compreende a

região CDR3 de SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é qualquer aminoácido; T93 é qualquer aminoácido; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas modalidades, o polipeptídeo (tal como um anticorpo) adicionalmente compreende uma cadeia pesada de anticorpo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a região CDR1 de SEQ ID NO: 9, em que I34 é S, L, V A, ou I; e N35 é N, T ou S; a região CDR2 de SEQ ID NO: 10, em que M50 é M, I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V; e a região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; em que Y110 é Y, K, S, R ou T; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a região CDR1 de SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q; a região CDR2 de SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T; e a região CDR3 de SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas modalidades, a região variável de cadeia leve compreende a região CDR3 de SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é qualquer aminoácido; T93 é qualquer aminoácido; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas modalidades, a região variável de cadeia pesada compreende a região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; em que Y110 é qualquer aminoácido. Em outras modalidades, a região variável de cadeia pesada compreende a região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que G98 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que G99 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido. Em algumas modalidades, o polipeptídeo

adicionalmente compreende uma cadeia leve de anticorpo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (como um anticorpo, inclusive um anticorpo humanizado) os quais compreendem uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 9, em que I34 é S, L, V A, ou I; e N35 é N, T ou S; uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 10, em que M50 é M, I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V; e uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; em que Y110 é Y, K, S, R ou T. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; e em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido. Em outras modalidades, o polipeptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11, em que G98 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que G99 é G, S, A, C, V, N, D, ou T; em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido. Em algumas modalidades, o polipeptídeo (tal como um anticorpo) adicionalmente compreende uma região variável de cadeia leve de anticorpo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo) os quais compreendem uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é D, S, A, ou Y; e H32 é H, N, ou Q; uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 13, em que I51 é I, T, V ou A; e S56 é S ou T; e uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é K, H, R, ou S; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas modalidades, o polipeptídeo com-

preende uma seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 14, em que S91 é S ou E; K92 é qualquer aminoácido; T93 é qualquer aminoácido; e em que Y96 é Y ou R. Em algumas modalidades, o polipeptídeo (tal como um anticorpo) adicionalmente compreende uma região variável de cadeia pesada de anticorpo.

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

é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é S, A, C, G, D, N, T, ou G; e em que Y110 é qualquer aminoácido. Em algumas modalidades, o polipeptídeo adicionalmente compreende uma região variável de cadeia leve de anticorpo.

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

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

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como anticorpos) compreendendo (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo: (i) uma região CDR1 de SEQ ID NO: 9, em que I34 é substituído com S, L, V A, ou I; e N35 é substituído com N, T ou S; (ii) uma região CDR2 de SEQ ID NO: 10, em que M50 é I, G, Q, S, ou L; A62 é A, ou S; e L63 é L ou V; e (iii) uma região CDR3 de SEQ ID NO: 11, em que Y100 é Y, L, ou R; em que Y101 é Y ou W; em que G103 é G, A, ou S; em que T104 é T ou S; em que S105 é S, A, ou T; em que Y106 é Y, R, T, ou M; em que Y107 é Y ou F; em que F108 é F ou W; em que D109 é D, N, ou G; em que Y110 é Y, K, S, R ou T; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo: (i) uma região CDR1 de SEQ ID NO: 12, em que S26 é S ou F; D28 é

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

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

Em algumas modalidades, polinucleotídeos (tais como um anticorpo) ligam NGF (tal como NGF humano). Em algumas modalidades, os polipeptídeos compreendem quaisquer das configurações de CDR (inclusive combinações, variações, e etc.) descritas aqui.

Conforme é evidente a partir da descrição aqui, a numeração de regiões variáveis usada aqui, é numeração seqüencial. Uma pessoa versada na técnica entende prontamente que existe uma série de sistemas de numeração de anticorpos (tais como numeração Kabat e Chothia), e como converter numeração seqüencial em outro sistema de numeração, tal como numeração Kabat ou numeração Chothia.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um polipeptídeo (tais como um anticorpo) compreendendo uma seqüência de aminoácidos (tal como uma seqüência CDR3) selecionada entre SEQ ID NO: 46 ou 50. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo adicionalmente compreende uma ou mais das seqüências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 6, 7, e 8. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo adicionalmente compreende uma ou mais das seqüências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 15.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um polipeptídeo (tal como um anticorpo) compreendendo uma seqüência de aminoácidos (tal como uma região CDR, tal como uma região CDR H1 e/ou CDR H2) selecionada entre (a) SEQ ID NOS: 28 e/ou 29; (b) SEQ ID NOS: 30 e/ou 31; (c) SEQ ID NOS: 32 e/ou 33; (d) SEQ ID NOS: 34 e/ou 35; (e) SEQ ID NOS: 36 e/ou 37; (f) SEQ ID NOS: 38 e/ou 39; e (g) SEQ ID NOS: 40 e 41. Em algu-

mas modalidades, o polipeptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos (tal como uma região CDR H1) selecionada entre SEQ ID NOS: 28, 30, 32, 34, 36, 38, e 40. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos (tal como uma região CDR H2) selecionada entre SEQ ID NOS: 29, 31, 33, 35, 37, 39 e 41. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo adicionalmente compreende uma ou mais das seqüências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 6, 7, e 8. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo adicionalmente compreende uma ou mais das seqüências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 15.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um polipeptídeo (tal como um anticorpo) compreendendo uma seqüência de aminoácidos (tal como uma região CDR, tal como uma região CDRL1 e/ou CDR L2) selecionada entre (a) SEQ ID NOS: 18 e/ou 19; (b) SEQ ID NOS: 20 e/ou 21; e (c) SEQ ID NOS: 22 e/ou 23. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos (tal como uma região CDR L1) selecionada entre SEQ ID NOS: 18, 20, e 22. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos (tal como uma região CDR L2) selecionada entre SEQ ID NOS: 19, 21, e 23. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo adicionalmente compreende uma ou mais das seqüências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 6, 7, 8. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo adicionalmente compreende uma ou mais das seqüências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 15.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um polipeptídeo (tal como um anticorpo) compreendendo uma seqüência de aminoácidos (tal como uma região CDR, tal como uma região CDRL3 e/ou CDR H3) selecionada entre (a) SEQ ID NOS: 51 e/ou 52; (b) SEQ ID NOS: 55 e/ou 56; (c) SEQ ID NOS: 57 e/ou 58; (c) SEQ ID NOS: 59 e/ou 60; (d) SEQ ID NOS: 61 e/ou 62; (e) SEQ ID NOS: 63 e/ou 64. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos (tal como uma região CDR L3) selecionada entre SEQ ID NOS: 51, 55, 57, 59, 61, e 63. Em algu-

mas modalidades, o polipeptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos (tal como uma região CDR H3) selecionada entre SEQ ID NOS: 52, 56, 58, 60, 62, e 64. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo adicionalmente compreende uma seqüência de aminoácidos mostrada em uma ou mais das SEQ ID NOS: 18, 19, 30 e 31. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo adicionalmente compreende uma ou mais das seqüências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 6, 7, e 8. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo adicionalmente compreende uma ou mais das seqüências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOS: 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 15.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um polipeptídeo (tal como um anticorpo) compreendendo uma ou mais de uma seqüência de aminoácidos (tal como uma região CDR) mostrada nas SEQ ID NOS: 61, 63, 18, 19, 30 e 31.

Em um aspecto, a invenção proporciona um anticorpo anti-NGF (tal como um anticorpo antagonista) que liga NGF (tal como NGF humano) com uma alta afinidade. Em algumas modalidades, alta afinidade é (a) ligação de NGF com uma K_D de menos de cerca de 2 nM (tais como any de cerca de 1 nM, 800 pM, 600 pM, 400 pM, 200 pM, 100 pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM, or less), e/ou uma "koff" de mais lento do que cerca de $6x10^{-5}$ s^{-1}); e/ou (b) inibição (redução, e/ou bloqueio) da sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM, ou menos; e/ou (c) inibição (redução, e/ou bloqueio) da sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 (na presença de cerca de 1.5 pM de NGF) de cerca de qualquer de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM, ou menos; e/ou (d) inibição (redução, e/ou bloqueio) da sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de rato de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer de 150 pM, 125 pM,

100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, ou menos; e/ou (e) inibição (redução, e/ou bloqueio) da sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de rato de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 (na presença de cerca de 1,5 pM de NGF) de cerca de qualquer de 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM, ou menos; e/ou (f) e/ou ligação de NGF com maior afinidade do que o receptor trkA.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (tais como um anticorpo), em que os polipeptídeos (a) ligam NGF (tal como NGF humano) com uma K_D de menos de cerca de 2 nM (tais como qualquer de cerca de 1 nM, 800 pM, 600 pM, 400 pM, 200 pM, 100pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM, ou menos), e/ou uma "koff" de mais lento do que cerca de $6x10^{-5}$ s^{-1}); e/ou (b) inibem a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM, ou menos; e/ou (c) inibem a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 (na presença de cerca de 1,5 pM de NGF) de cerca de qualquer de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM, ou menos; e/ou ligam NGF com maior afinidade do que o receptor trkA. Em algumas modalidades, os polipeptídeos (a) ligam NGF com uma K_D de menos de cerca de 2 nM; e/ou (b) inibem a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 100 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 15 pM de NGF; e/ou (c) inibem a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 10 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 1.5 pM de NGF, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 15 pM de NGF. Em algumas modalidades, os polipeptídeos (a) ligam NGF com uma K_D de menos de cerca de 100 pM; e/ou (b) inibem a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurô-

nios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 20 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 15 pM de NGF; e/ou (c) inibem a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 2 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 1,5 pM de NGF.

Conforme é evidente a partir da descrição aqui, especificamente excluídos da invenção estão modalidades de polipeptídeos consistindo na seqüência de aminoácidos idêntica a uma seqüência de aminoácidos de anticorpo monoclonal de camundongo, 911. As seqüências de CDR estendidas de Mab 911 são mostradas nas Figuras 1A e 1B, e nas SEQ ID NOS: 9-14.

Em algumas modalidades, a invenção proporciona quaisquer dos polipeptídeos ou anticorpos acima, adicionalmente em que o polipeptídeo (tal como um anticorpo) é isolado. Em algumas modalidades, o polipeptídeo (tal como um anticorpo) é essencialmente purificado. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo (tal como um anticorpo) é maturado por afinidade. Em outras modalidades, o anticorpo é um anticorpo antagonista. Em algumas modalidades, o polipeptídeo (tal como um anticorpo) compreende seqüências de estrutura humana. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo (tal como um anticorpo) compreende um ou mais resíduos de estrutura não humana. Em algumas modalidades, o polipeptídeo (tal como um anticorpo) liga NGF (tal como NGF humano) com uma K_D de 2 nM ou menos. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma ou mais (tais como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou mais) substituições de aminoácidos humanos em relação a uma seqüência de aminoácidos não humana (tal como uma seqüência de região variável, tais como uma seqüência de CDR, tal como uma seqüência de estrutura). Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende no mínimo 1, no mínimo 2, ou mais tal como no mínimo 3, 4, 5, 6, ou mais substituições de aminoácidos em relação a uma seqüência de aminoácidos do polipeptídeo de origem (tal como uma seqüência de aminoácidos do anticorpo 911, tal como qualquer uma ou mais das SEQ ID NOs 9-14). Em algumas modalidades, a afinidade de ligação do anticorpo foi alterada

(em algumas modalidades, aumentada) em relação a um anticorpo de origem (tal como Mab 911) afinidade. Em ainda outras modalidades, a afinidade de ligação do anticorpo é menor do que a afinidade de ligação do receptor trkA para NGF (tal como NGF humano). Em algumas modalidades, os polipeptídeos podem ser anticorpos. Em algumas modalidades, os anticorpos são anticorpos humanos. Em outras modalidades, os anticorpos são anticorpos humanizados. Em ainda outras modalidades, os anticorpos são anticorpos monoclonais. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo maturado por afinidade.

A invenção proporciona polinucleotídeos (inclusive polinucleotídeo isolado) compreendendo polinucleotídeos codificando quaisquer das modalidades acima.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um polinucleotídeo isolado compreendendo um polinucleotídeo codificando um fragmento ou uma região do anticorpo E3 (interchangeably termed "E3" herein). Em uma modalidade, o fragmento é uma cadeia leve do anticorpo E3 conforme mostrado na Figura 1B. Em outra modalidade, o fragmento é uma cadeia pesada do anticorpo E3 conforme mostrado na Figura 1A. Em ainda outra modalidade, o fragmento contém uma ou mais regiões variáveis de uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada do anticorpo E3. Em ainda outra modalidade, o fragmento contém uma ou mais regiões de determinação da complementaridade (CDRs) de uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada do anticorpo E3 conforme mostrado nas Figuras 1A e 1B.

Em outro aspecto, a invenção é um polinucleotídeo isolado compreendendo um polinucleotídeo que codifica para o anticorpo E3. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende qualquer um ou ambos do polinucleotídeo mostrado nas Figuras 2 e 3.

Em outro aspecto, a invenção é um polinucleotídeo isolado que codifica para uma cadeia leve E3 com um número de depósito de ATCC No. PTA-4893 ou ATCC No. PTA-4894. Em outro aspecto, a invenção é um polinucleotídeo isolado que codifica para uma cadeia pesada E3 com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895. Em ainda outro aspecto, a invenção

é um polinucleotídeo isolado compreendendo (a) uma região variável codificada no polinucleotídeo com um número de depósito de ATCC No. PTA-4893 ou PTA-4894 e (b) uma região variável codificada no polinucleotídeo com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895. Em outro aspecto, a invenção é um polinucleotídeo isolado compreendendo (a) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleotídeo com um número de depósito de ATCC No. PTA-4893 ou PTA-4894; e/ou (b) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleotídeo com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polinucleotídeos codificando quaisquer dos anticorpos (inclusive fragmentos de anticorpos) ou polipeptídeos descritos aqui.

Em outro aspecto, a invenção proporciona vetores (inclusive vetores de expressão e clonagem) e células hospedeiras compreendendo quaisquer dos polinucleotídeos descritos aqui.

Conforme é evidente a partir da descrição aqui, especificamente incluídas da invenção estão modalidades de polinucleotídeos consistindo na seqüência de polinucleotídeos idênticas a uma seqüência de polinucleotídeos de anticorpo monoclonal de camundongo, 911. As seqüências de CDR estendidas de Mab 911 são mostrada nas Figuras 1A e 1B, e na SEQ ID NOS: 9-14.

Em outro aspecto, a invenção é uma célula hospedeira compreendendo um polinucleotídeo codificando cadeia leve E3 e um polinucleotídeo codificando cadeia pesada E3, em que o um ou mais polinucleotídeos codificando cadeia leve E3 tem um número de depósito de ATCC No. PTA-4893 e/ou ATCC No. PTA-4894, e o polinucleotídeo codificando cadeia pesada E3 tem um número de depósito de ATCC No. PTA-4895. Em algumas modalidades, a célula hospedeira compreende polinucleotídeo compreendendo (a) uma região variável codificada no polinucleotídeo com um número de depósito de ATCC No. PTA-4893 ou PTA-4894 e/ou (b) uma região variável codificada no polinucleotídeo com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895. Em algumas modalidades, a célula hospedeira compreende um polinucleotídeo codificando (a) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleotí-

deo com um número de depósito de ATCC No. PTA-4893 ou PTA-4894; e/ou (b) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleotídeo com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

Em outro aspecto, a invenção é um complexo de NGF ligado por anticorpo E3. Em outro aspecto, o complexo é isolado. Em outro aspecto, o complexo é substancialmente purificado.

Em outro aspecto, a invenção é um complexo de NGF ligado por quaisquer dos anticorpos ou polipeptídeos descritos aqui. Em outro aspecto, o complexo é isolado. Em outro aspecto, o complexo é substancialmente purificado.

Em outro aspecto, a invenção é uma composição farmacêutica compreendendo quaisquer dos polipeptídeos (inclusive anticorpos tais como anticorpo E3) ou polinucleotídeos descritos aqui, tais como composições farmacêuticas compreendendo o anticorpo E3 ou um anticorpo compreendendo um fragmento do anticorpo E3, e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

Em outro aspecto, a invenção é um método para gerar anticorpo E3 compreendendo preparar uma célula hospedeira compreendendo um vetor de expressão que codifica para o anticorpo E3; cultivar a célula hospedeira ou progênie da mesma sob condições que permitem a produção do anticorpo E3; e purificar o anticorpo E3. Em algumas modalidades, o vetor de expressão compreende uma ou ambas as seqüências de polinucleotídeos mostrada nas Figuras 2 e 3.

Em outro aspecto, a invenção é um método para gerar o anticorpo E3 compreendendo expressar um polinucleotídeo codificando cadeia leve E3 e um polinucleotídeo codificando cadeia pesada E3 em uma célula adequada, em que o polinucleotídeo codificando cadeia leve E3 tem um número de depósito de ATCC No. PTA-4893 e/ou ATCC No. PTA-4894, e o polinucleotídeo codificando cadeia pesada E3 tem um número de depósito de ATCC No. PTA-4895; geralmente seguida por recuperação e/ou isolamento do anticorpo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para gerar quaisquer dos polipeptídeos (tais como anticorpos) descritos aqui, por expressão de um ou mais polinucleotídeos codificando o anticorpo (o qual pode ser separadamente expressado como uma única cadeia leve ou pesada, ou tanto uma cadeia leve quanto uma cadeia pesada podem ser expressada por um vetor) em uma célula adequada, geralmente seguido por recuperação e/ou isolamento do anticorpo ou polipeptídeos de interesse.

Em outro aspecto, a invenção é um método para antagonizar a atividade biológica de NGF (tal como NGF humano) usando quaisquer dos polipeptídeos (inclusive anticorpos tais como anticorpo E3) descritos aqui. Em uma modalidade, o método compreende contactar fator de crescimento nervoso humano com quaisquer dos polipeptídeos (inclusive anticorpo E3) descritos aqui, por meio do quê a atividade de NGF (tal como a atividade do fator de crescimento nervoso humano) é antagonizada, reduzida, bloqueada, ou suprimida.

Em outro aspecto, a invenção é um método para detectar NGF usando quaisquer dos polipeptídeos (inclusive anticorpos, tais como o anticorpo E3) descritos aqui. A presença de NGF é detectada detectando um complexo entre NGF e quaisquer dos polipeptídeos descritos aqui, (tais como anticorpo E3). O termo "detecção" conforme usado aqui, inclui detecção qualitativa e/ou quantitativa (medição dos níveis) com ou sem referência a um controle.

Em outro aspecto, a invenção é um método para tratar dor por administração de uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo o anticorpo E3 ou quaisquer das modalidades de polipeptídeos (inclusive anticorpo) ou polinucleotídeos descritas aqui. Em algumas modalidades, a dor é dor pós-cirúrgica.

Em outro aspecto, a invenção é um método para prevenir ou tratar a dor da artrite reumatóide em um indivíduo administrando uma quantidade eficaz de anticorpo antagonista anti-NGF ao indivíduo. Foi mostrado de acordo com a invenção que um anticorpo antagonista anti-NGF é capaz de inibir ou bloquear a dor associada a artrite reumatóide. Em algumas modali-

dades, a dor é aliviada dentro de cerca de 24 horas depois de administrar o anticorpo antagonista anti-NGF. Em algumas modalidades, a dor é aliviada dentro de cerca de 4 dias depois de administrar o anticorpo antagonista anti-NGF. Em algumas modalidades, a dor é aliviada antes de observar ou na ausência de uma indicação de melhora da condição inflamatória no indivíduo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para reduzir a incidência de dor da artrite reumatóide, melhorar a dor da artrite reumatóide, suprimir a dor da artrite reumatóide, aliviar a dor da artrite reumatóide, e/ou retardar o início, o desenvolvimento, ou a progressão da dor da artrite reumatóide em um indivíduo, o método referido compreendendo administrar uma quantidade eficaz de anticorpo antagonista anti-NGF ao indivíduo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para tratar caquexia inflamatória (perda de peso) associada a artrite reumatóide em um indivíduo compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF.

Em outro aspecto, a invenção é um método para prevenir ou tratar dor de osteoartrite em um indivíduo administrando uma quantidade eficaz de um antagonista do fator de crescimento nervoso (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF) ao indivíduo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para reduzir a incidência da dor de osteoartrite, melhorar a dor de osteoartrite, suppressão da dor de osteoartrite, aliviar a dor de osteoartrite, e/ou retardar o início, o desenvolvimento, ou a progressão da dor de osteoartrite em um indivíduo, o método referido compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) ao indivíduo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para melhorar a função física em um indivíduo tendo osteoartrite, o método referido compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) ao indivíduo.

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para melhorar a rigidez em um indivíduo tendo osteoartrite, o método referido compre-

endendo administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) ao indivíduo.

Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano. Em algumas modalidades, para tratar dor de osteoartrite, freqüência de dosagem de anticorpo antagonista anti-NGF é entre uma vez a cada semana e uma vez a cada 10 semanas, ou menos freqüente.

Em outro aspecto, a invenção proporciona kits e composições compreendendo qualquer uma ou mais das composições descritas aqui. Estes kits, geralmente dentro de embalagem adequada e providos com instruções apropriadas, são úteis para quaisquer dos métodos descritos aqui. A invenção também proporciona composições farmacêuticas para uso em quaisquer dos métodos descritos aqui, cujas composições compreendem uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF (tal como um anticorpo anti-NGF) e um veículo farmaceuticamente aceitável.

A invenção também proporciona quaisquer das composições e kits descritos para qualquer uso descrito aqui, quer no contexto de uso como medicamento e/ou uso para fabricação de um medicamento.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

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

A FIGURA 1B: mostra a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia leve do anticorpo E3 (rotulada "5" ou "4 + maturação de afinidade L3). As CDRs Chothia e CDRs Kabat são representadas por texto sublinhado e texto em negrito e em itálico, respectivamente. A FIGURA 1B também mostra o alinhamento das seguintes seqüências de aminoácidos de região variável de cadeia leve: (2) seqüência aceitadora de linhagem germinativa humana O8 (rotulada "O8" ou "2") (SEQ ID NO: 73); (3) as seqüências aceitadoras enxertadas com as CDRs estendidas do anticorpo camundongo 911 (rotuladas "enxertada com CDR" ou "3") (SEQ ID NO: 74); (4) as seqüências aceitadoras enxertadas com CDR (rotuladas "3+ maturação de afinidade L1, L2" ou "4") (SEQ ID NO: 75); (5) o clone contendo CDRs de afinidade maturada L1 e L2 (rotuladas "5" ou "4+ maturação de afinidade L3"); e anticorpo E3 (conforme descrito acima).

A FIGURA 2: mostra um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo seqüência codificando a região variável de cadeia pesada do anticorpo E3 (SEQ ID NO: 76).

A FIGURA 3: mostra um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo seqüência codificando a região variável de cadeia leve do anticorpo E3 (SEQ ID NO: 77).

A FIGURA 4: é um gráfico representando a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de neurônios E13.5 na presença de concentração variável de NGF humano e de rato. O eixo X corresponde à concentração de NGF (ng/ml) e o eixo Y corresponde aos neurônios contados.

A FIGURA 5: é um gráfico comparando o efeito de bloqueio de NGF de vários Fabs na presença de ou 0,04 ng/ml de NGF humano (cerca de 1,5 pM; mostrada no painel inferior) ou 0,4 ng/ml de NGF humano (cerca de 15 pM; mostrada no painel superior). Foi avaliada a sobrevida de neurônios trigeminais de camundongo E13.5 em várias concentrações de Fab E3; 911 Fab murino; e Fab H19-L129 e Fab 8L2-6D5. A IC50 (em pM) foi calculada para cada Fab em cada concentração de NGF, e é mostrada na Tabela 9. Fab E3 bloqueou fortemente a sobrevida de neurônios trigeminais NGF-dependentes humanos, com uma IC50 de cerca de 21 pM na presença de

15 pM de humano NGF, e uma IC50 de cerca de 1,2 pM na presença de 1,5 pM de NGF humano. Fabs 3C e H19-L129 também bloquearam fortemente a sobrevida de neurônios trigeminais NGF-dependentes humanos. Em ambos os painéis, o eixo X corresponde à concentração de anticorpos (nM) e o eixo Y corresponde aos neurônios contados. 1,5 pM de NGF foi em torno da IC50, enquanto 15 pM representou uma concentração saturante de NGF.

A FIGURA 6: é um gráfico comparando o efeito de bloqueio de NGF de vários Fabs na presença de ou 0,04 ng/ml de NGF de rato (cerca de 1,5 pM; mostrada no painel inferior) ou 0,4 ng/ml NGF de rato (cerca de 15 pM; mostrada no painel superior). A sobrevida de neurônios trigeminais de camundongo E13.5 em várias concentrações de Fab E3; Fab 911 murino; e Fab H19-L129 e 8L2-6D5 foi avaliada conforme descrito acima. A IC50 (em pM) foi calculada para cada Fab em cada concentração de NGF, e é mostrada na Tabela 9. Fab E3 bloqueou fortemente a sobrevida de neurônios trigeminais NGF-dependentes humanos, com uma IC50 de cerca de 31,6 pM na presença de 15 pM de NGF de rato, e uma IC50 de cerca de 1,3 pM na presença de 1,5 pM de NGF de rato. Fabs 3C e H19-L129 também bloquearam fortemente a sobrevida de neurônios trigeminais NGF-dependentes de rato. 1,5 pM de NGF foi em torno da IC50, enquanto 15 pM representou uma concentração saturante de NGF. Em ambos os painis, o eixo X corresponde à concentração de anticorpos (nM) e o eixo Y corresponde aos neurônios contados.

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

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

A FIGURA 9: é um gráfico mostrando os resultados de análise

BIAcore da afinidade de ligação a NGF humano do anticorpo de camundongo 911 (Fab). Anticorpo de camundongo 911 ligou a NGF com uma K_D de 3,7 nM, "koff" de 8.4x10-5s-1 e kon de 2.2x104Ms-1.

A FIGURA 10: é um gráfico mostrando os resultados de análise BIAcore da afinidade de ligação a NGF humano do anticorpo E3 (Fab) (referido como "3E Fab"). E3 ligou NGF humano com uma KD de cerca de 0,07 nM (e com uma kon de cerca de 6,0 x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$, e uma "koff" de cerca de 4,2x10^{-5} s^{-1}).

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

A FIGURA 12: é um gráfico representando a capacidade de bloqueio do NGF humano de anticorpo total E3 e Fab E3. Foi avaliada a sobrevida de neurônios trigeminais de camundongo E13.5 na presença de NGF humano e vários concentrações de Fab E3 e anticorpo E3. O eixo X corresponde à ligação de sítios de NGF (nM) e o eixo Y corresponde à contagem normalizada de neurônios trigeminais (TG). O anticorpo total E3 e Fab 3E apresentaram níveis similares de inibição da sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de neurônios trigeminais quando a concentração de anticorpo total e Fab foram normalizadas para o número de sítios de ligação de NGF (Fab tem um sítio de ligação e o anticorpo total tem dois sítios de ligação).

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

anticorpo E3 (triângulos sólidos; referido como "3E"), anticorpo 911 (círculos sólidos), e uma imunoadesina receptora de trkA (quadrados sombreados; referida como "trkA-Fc) para inibir a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de neurônios trigeminais E13.5 na presença de 0,4 ng/ml de NGF humano (condições de saturação). O eixo X corresponde à concentração do anticorpo (nM) e a concentração de Y corresponde aos neurônios contados. Estes resultados demonstraram que o anticorpo E3 bloqueou NGF significativamente melhor do que quer o anticorpo anti-NGF monoclonal de camundongo 911 quer a imunoadesina de trkA.

A FIGURA 14: é um gráfico representando que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 (denominado "3E na figura") ou Fab 911 não inibiram a sobrevida neuronal promovida por NT3, NT4/5 e MSP, mesmo em concentrações de anticorpos tão elevadas quanto 200 nM. Os dados representaram percentagem de sobrevida média depois de 48 horas em cultura (± erro padrão da média, n = 3 para cada ponto de dados) relativa à sobrevida observada no controle positivo para cada experimento (100% de sobrevida de neurônios trigeminais cultivados na presença de concentração de NGF saturante). Várias concentrações (20 nM, 2 nM, ou 0,2 nM) de E3 Fab (denominado "3E" na figura) e anticorpo de camundongo 911 Fab foram usadas na presença de neurotrofina não adicionada (denominada "controle"), 400 pM de NGF (denominado "NGF-400pM), 10 nM de NT3 (denominado "NT3-10nM) ou 600 pM de MSP (denominado "MSP-600 pM).

A FIGURA 15: é um gráfico representando que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 (Fab ou anticorpo total) (denominado "3E na figura") ou anticorpo de camundongo 911 (Fab ou anticorpo total) não inibiu a sobrevida neuronal promovida por NT3, NT4/5 e MSP, mesmo em concentrações de anticorpos tão elevadas quanto 200 nM. Várias concentrações (200 nM e 80 nM) de E3 Fab e anticorpo total e anticorpo de camundongo 911 anticorpo total e Fab foram usadas na presença de neurotrofinas não adicionadas (denominadas "sem fatores"), 400 pM de NGF (denominado "NGF-400pM), 10 nM de NT3 (denominado "NT3-10nM) ou 600 pM de MSP (denominado "MSP-600 pM).

A FIGURA 16: é um gráfico representando que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 ou Fab E3 não inibiu a sobrevida de neurônios nodosos E17 promovida por BDNF, NT4/5 ou LIF. Anticorpo antagonista anti-NGF de camundongo 911 também foi testado, e foram observados resultados similares. Várias concentrações (200 nM ou 80 nM) de anticorpo total E3 (denominado "3E na figura"), Fab E3, anticorpo total 911, ou Fab 911 foram testadas na presença de neurotrofinas não adicionadas (denominado "sem fatores"), 400 pM de BDNF (denominado "BDNF-400pM), 400 pM de NT4/5 (denominado "NT4/5-400pM), ou 2,5 nM de LIF (denominado "LIF-2.5 nM).

A FIGURA 17: é um gráfico representando que o anticorpo antagonista anti-NGF E3 ou Fab E3 não inibiu a sobrevida de neurônios nodosos E17 promovida por BDNF, NT4/5 ou LIF. Várias concentrações (200 nM, 20 nM, 2 nM) de Fab E3 (denominado "3E na figura"), ou Fab 911 foram testadas na presença de neurotrofinas não adicionadas (denominadas "controle"), 400 pM de BDNF (denominado "BDNF-400pM), 400 pM de NT4/5 (denominado "NT4/5-400pM), ou 2,5 nM de LIF (denominado "LIP-2.5 nM).

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

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

A FIGURA 20: é um gráfico demonstrando a reação nociceptiva em ratos artríticos (modelo de artrite reumatóide) depois da administração de

diferentes doses de anticorpo anti-NGF E3 (0,003 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg, and 5 mg/kg) on D14 and D18. Os valores da intensidade da vocalização são expressados em mV como médias ± s.e.m.

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

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

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

A FIGURA 24 representa as alterações na intensidade da dor diária média depois da administração de anticorpo anti-NGF E3 comparada com a linha de base no dia 0. O eixo Y corresponde à redução na intensidade da dor diária média (escore de VAS) comparada com a intensidade da dor diária média no dia 0. O eixo X corresponde a dias depois da administração de anticorpo anti-NGF E3.

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

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

A FIGURA 27 representa a resposta média quadrada mínima (LSM) para WOMAC, subescala da dor, subescala da função física , e subescala da rigidez do dia 1 ao dai 28 depois da administração de diferentes doses (3 μg/kg, 10 μg/kg, 30 μg/kg, 100 μg/kg, e 300 μg/kg) de anticorpo

anti-NGF E3. "SE" se refere a erro padrão. Os eixos X correspondem à dose de anticorpo anti-NGF E3 administrada. "*" indica $P < 0,05$ comparado com a linha de base segundo o ensaio de Dunnett.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção descrita aqui, proporciona anticorpos antagonistas anti-NGF que ligam o fator de crescimento nervoso (tais como o fator de crescimento nervoso humano) com alta afinidade. A invenção adicionalmente proporciona anticorpos e polipeptídeos derivados de E3 que ligam NGF, e métodos para fabricar e usar estes anticorpos. Em algumas modalidades, a invenção proporciona um anticorpo humanizado, E3, o qual liga ao fator de crescimento nervoso ("NGF"), e métodos para fabricar e usar este anticorpo. A invenção também proporciona E3 polipeptídeos (inclusive anticorpos) que ligam NGF, e polinucleotídeos codificando anticorpo E3 e/ou polipeptídeo.

A invenção descrita aqui, também proporciona métodos para prevenir e/ou tratar dor da artrite reumatóide em um indivíduo por administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF.

A invenção descrita aqui, também proporciona métodos para prevenir e/ou tratar dor de osteoartrite em um indivíduo por administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF).

A invenção também proporciona métodos para ajustar a afinidade de um anticorpo e métodos para caracterizar uma região CDR.

Técnicas Gerais

A prática da presente invenção empregará, a menos que indicado de modo diverso, técnicas convencionais de biologia molecular (inclusive técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular, bioquímica e imunologia, as quais estão dentro do âmbito da arte. As técnicas referidas são explicadas integralmente na literatura, tais como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis,

ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); e Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Definições

Um "anticorpo" é uma molécula de imunoglobulina capaz de ligação específica a um alvo, tal como um carboidrato, polinucleotídeo, lipídeo, polipeptídeo, e etc., através de no mínimo um sítio de reconhecimento antigênico, localizado na região variável da molécula de imunoglobulina. Conforme usado aqui, o termo engloba não somente anticorpos intactos policlonais ou monoclonais, mas também fragmentos dos mesmos (tais como Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv), cadeia única (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão compreendendo um porção anticorpo, e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreenda um sítio de reconhecimento antigênico. Um anticorpo inclui um anticorpo de qualquer classe, tal como IgG, IgA, ou IgM (ou sub-classe das mesmas), e o anticorpo não precisa ser de qualquer classe em particular. Dependendo da seqüência de aminoácidos do anticorpo do domínio constante de suas ca-

deias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Há cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e vários destes podem ser adicionalmente divididos em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são denominados alfa, delta, épsilon, gama, e mu, respectivamente. As estructuras das subunidades e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são de conhecimento geral

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

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

Um "anticorpo monoclonal" se refere a uma população de anticorpos homogêneos em que o anticorpo monoclonal consiste em aminoácidos (naturais e não naturais) que estão envolvidos na ligação seletiva de um antígeno. Uma população de anticorpos monoclonais é altamente específica, sendo dirigida contra um único sítio antigênico. O termo "monoclonal anti-

corpo" engloba não somente anticorpos monoclonais intatos como anticorpos monoclonais de extensão total, mas também fragmentos dos mesmos (tais como Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv), cadeia única (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão compreendendo uma porção anticorpo, e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreende um sítio de reconhecimento antigênico da especificidade requerida e a capacidade para ligar a um antígeno. Não se pretende ser limitado com respeito à fonte do anticorpo ou à maneira na qual este é feito (por exemplo, por hibridoma, seleção de fago, expressão recombinante, animais transgênicos, e etc.).

Conforme usado aqui, "anticorpo humano" significa um anticorpo tendo uma seqüência de aminoácidos correspondente à de um anticorpo produzido por um ser humano e/ou que tenha sido feito usando quaisquer das técnicas para preparar anticorpos humanos conhecidos na técnica ou descritos aqui. Esta definição de um anticorpo humano inclui anticorpos compreendendo no mínimo um polipeptídeo de cadeia pesada humano ou no mínimo um polipeptídeo de cadeia leve humano. Um exemplo semelhante é um anticorpo compreendendo polipeptídeos de cadeia leve murino e de cadeia pesada humano. Anticorpos humanos podem ser produzidos usando vários técnicas conhecidas na técnica. Em uma modalidade, o anticorpo humano é selecionado entre uma biblioteca de fagos, onde a biblioteca de fagos expressa anticorpos humanos (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS*, (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Anticorpos humanos também podem ser produzidos introduzindo loci de imunoglobulina humana em animais transgênicos, por exemplo, camundongos nos quais os genes de imunoglobulina endógenos foram parcialmente ou completmente inativados. Esta abordagem é descrita nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; e 5.661.016. Alternativamente, o anticorpo humano pode ser preparado imortalizando linfócitos B humanos que produzem um anticorpo dirigido contra um antígeno alvo (os linfócitos B referidos podem ser recupera-

dos de um indivíduo ou podem ter sido imunizados *in vitro).* Veja, por exemplo, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,* Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; e a Patente dos Estados Unidos No. 5.750.373.

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

Uma "região Fc funcional" possui no mínimo uma função efetora de uma região Fc de seqüência nativa. "Funções efetoras" típicas incluem ligação de C1q; citotoxicidade dependente do complemento (CDC); ligação de receptor de Fc; citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependentes (ADCC); fagocitose; regulação para baixo de receptores superficiais celulares (por exemplo, receptor de células B; BCR), etc. As funções efetoras referidas geralmente requerem que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (por exemplo, um domínio variável de anticorpo) e podem ser

avaliadas usando vários ensaios conhecidos na técnica para avaliar as funções efetoras de anticorpos referidas.

Uma "região Fc de seqüência nativa" compreende uma seqüência de aminoácidos idêntica à seqüência de aminoácidos de uma região Fc encontrada na natureza. Uma "região Fc variante" compreende uma seqüência de aminoácidos a qual difere daquela de uma região Fc de seqüência nativa em virtude de no mínimo uma modificação de aminoácido, mas retém no mínimo uma função efetora da região Fc de seqüência nativa. Preferencialmente, a região Fc variante tem no mínimo uma substituição de aminoácido comparada com uma região Fc de seqüência nativa ou com a região Fc de um polipeptídeo de origem, por exemplo, a partir de cerca de uma até cerca de dez substituições de aminoácidos, e preferencialmente a partir de cerca de uma até cerca de cinco substituições de aminoácidos em uma região Fc de seqüência nativa ou na região Fc do polipeptídeo de origem. A região Fc variante aqui, preferencialmente possuirá no mínimo cerca de 80% de identidade de seqüência com uma região Fc de seqüência nativa e/ou com uma região Fc de um polipeptídeo de origem, e ainda mais preferencialmente no mínimo cerca de 90% de identidade de seqüência com a mesma, mais preferencialmente no mínimo cerca de 95% de identidade de seqüência com a mesma.

Conforme usado aqui "citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependentes" e "ADCC" se referem a uma reação mediada por células na qual células citotóxicas não-específicas que expressam receptores de Fc (FcRs) (por exemplo, células assassinas naturais (NK), neutrófilos, e macrófagos) reconhecem anticorpo ligado sobre uma célula alvo e em seguida causam lise da célula alvo. A atividade de ADCC de uma molécula de interesse pode ser avaliada usando um ensaio de ADCC *in vitro*, tal como as descritas na Patente dos Estados Unidos No. 5.500.362 ou 5.821.337. Células efetoras úteis para os ensaios referidas incluen células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células NK. Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, em um modelo animal tal como o descrito em Clynes et

al., 1998, *PNAS* (USA), 95:652-656.

Conforme usado aqui, "receptor de Fc" e "FcR" descrevem um receptor que liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferencial é um FcR humano de seqüência nativa. Além disso, um FcR preferencial é um o qual liga um anticorpo de IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasses FcγRI, FcγRII, e FcγRIII, inclusive variantes alélicas e alternativamente formas unidas destes receptores. Receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor de ativação") e FcγRIIB (um "receptor de inibição"), os quais têm seqüências de aminoácidos similares que diferem essencialmente nos domínios citoplasmáticos dos mesmos. FcRs são revisados em Ravetch and Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel et al., 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; e de Haas et al., 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41. "FcR" também inclui o receptor neonatal, FcRn, o qual é responsável pela transferência de IgGs maternas para o feto (Guyer et al., 1976, *J. Immunol.*, 117:587; e Kim et al., 1994, *J. Immunol.*, 24:249).

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

Conforme usado aqui, os termos "E3", "3E", e "anticorpo E3" são usados de modo intercambiável para se referir a um anticorpo compreendendo a seqüência de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve mostrada nas Figuras 1A (SEQ ID NO: 1) e 1B (SEQ ID NO: 2), respectivamente. As porções CDR do anticorpo E3 (inclusive CDRs de Chothia e Kabat) são representadas diagramaticamente nas Figuras 1A e 1B. As Figuras 2 e 3 mostram polinucleotídeos codificando cadeias pesadas e leves, respectivamente, compreendendo as regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve mostradas nas Figuras 1A e 1B, respectivamente. A produção e caracterização de E3 é descrita nos Exemplos. Funções biológi-

cas diferentes são associadas com E3, inclusive, mas não limitadas a, capacidade para ligar a NGF e inibir atividade biológica de NGF e/ou um ou mais caminhos a jusante mediados por sinalização de NGF; e capacidade para inibir a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo. Conforme discutido aqui, os anticorpos da invenção podem ter qualquer uma ou mais destas características. Em algumas modalidades, o termo "E3" se refere a imunoglobulina codificada por (a) um polinucleotídeo codificando cadeia leve de E3 que tem um número de depósito de ATCC No. PTA-4893 ou ATCC No. PTA-4894, e (b) um polinucleotídeo codificando cadeia pesada de E3 que tem um número de depósito de ATCC No. PTA-4895.

Conforme usado aqui, ligação "imunoespecífica" de anticorpos se refere à interação de ligação antígeno específica que ocorre entre o sítio de combinação de antígeno de um anticorpo e o antígeno específico reconhecido por aquele anticorpo (isto é, o anticorpo reage com a proteína em um imunoensaio ELISA ou diverso, e não reage de modo detectável com proteínas não relacionadas).

Um epitopo que "liga especificamente", ou "liga preferencialmente" (usados de modo intercambiável aqui) a um anticorpo ou um polipeptídeo é um termo de conhecimento geral na técnica, os e métodos para determinar a ligação específica ou preferencial referida também são de conhecimento geral na técnica. Diz-se que uma molécula apresenta "ligação específica" ou "ligação preferencial" se reagir ou associar mais freqüentemente, mais rapidamente, com maior duração e/ou com maior afinidade com uma célula ou substância em particular do que o faz com células ou substâncias alternativas. Um anticorpo "liga especificamente" ou "liga preferencialmente" a um alvo se ligar com maior afinidade, avidez, mais prontamente, e/ou com maior duração do que liga a outras substâncias. Por exemplo, um anticorpo que liga especificamente ou preferencialmente a um epitopo de NGF é um anticorpo que liga este epitopo com maior afinidade, avidez, mais prontamente, e/ou com maior duração do que liga a outros epitopos de NGF ou não epitopos de NGF. Também se entende pela leitura desta definição que, por e-

xemplo, um anticorpo (ou porção ou epitopo) que liga especificamente ou preferencialmente a um primeiro alvo pode ou não ligar especificamente ou preferencialmente a um segundo alvo. Deste modo, "ligação específica" ou "ligação preferencial" não requer necessariamente (embora possa incluir) ligação exclusiva. Geralmente, mas não necessariamente, referência a ligação significa ligação preferencial.

Os termos "polipeptídeo", "oligopeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados de modo intercambiável aqui, para referir a polímeros de aminoácidos de qualquer extensão. O polímero pode ser linear ou ramificado, pode compreender aminoácidos modificados, e pode ser interrompido por não aminoácidos. Os termos também englobam um polímero de aminoácidos que tenha sido modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo, formação de ligação dissulfeto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação, ou qualquer outra manipulação ou modificação, tal como conjugação com um componente de marcação. Também incluídos dentra da definição estão, por exemplo, polipeptídeos contendo um ou mais análogos de um aminoácido (inclusive, por exemplo, aminoácidos não naturais, e etc.), bem como outras modificações conhecidas na técnica. Entende-se que, como os polipeptídeos desta invenção se baseiam em um anticorpo, os polipeptídeos podem ocorrer como cadeias únicas ou cadeias associadas.

"Polinucleotídeo," ou "ácido nucléico," conforme usado de modo intercambiável aqui, se referem a polímeros de nucleotídeos de qualquer extensão, e incluem DNA e RNA. Os nucleotídeos podem ser desoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos, bases ou nucleotídeos modificados, e/ou seus análogos, ou qualquer substrato que pode ser incorporado em um polímero por DNA ou RNA polimerase. Um polinucleotídeo pode compreender nucleotídeos modificados, tais como nucleotídeos metilados e seus análogos. Caso presente, a modificação da estrutura do nucleotídeo pode ser conferida antes ou depois de montagem do polímero. A seqüência de nucleotídeos pode ser interrompida por componentes não-nucleotídeo. Um polinucleotídeo pode ser adicionalmente modificado depois de polimerização, tal como por conjugação com um componente de marcação. Outros tipos de modificações

incluem, por exemplo, "*caps*", substituição de um ou mais dos nucleotídeos que ocorrem naturalmente com um análogo, modificações de internucleotídeos tais como, por exemplo, as com ligações não carregadas (por exemplo, fosfonatos de metila, fosfotriésteres, fosfoamidatos, cabamatos, e etc.) e com ligações carregadas (por exemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, e etc.), as ligações contendo porções pendentes, tais como, por exemplo, proteínas (por exemplo, nucleases, toxinas, anticorpos, peptídeos de sinalização, ply-L-lisina, e etc.), as ligações com intercaladores (por exemplo, acridina, psoralen, e etc.), as ligações contendo quelantes (por exemplo, metais, metais radioativos, boro, metais oxidativos, e etc.), as ligações contendo alquiladores, aquelas com ligações modificadas (por exemplo, ácidos nucleícos alfa anoméricos, e etc.), bem como formas não modificadas do um ou mais polinucleotídeos. Além disso, quaisquer dos grupos oxidrila ordinariamente presentes nos açúcares podem ser substituídos, por exemplo, por grupos fosfonatos, grupos fosfato, protegidos por grupos protetores de rotina, ou ativados para preparar ligações adicionais a nucleotídeos adicionais, ou podem ser conjugadas a suportes sólidos. A OH 5' e 3' terminal pode ser fosforilada ou substituída com aminas ou porções de grupos de capeamento orgânico de a partir de 1 a 20 átomos de carbono. Outas oxidrilas também podem ser derivadas para grupos protetores de rotina. Polinucleotídeos também podem conter formas análogas de açúcares ribose ou desoxirribose que são conhecidos de modo geral na técnica, inclusive, por exemplo, 2'--O-metila-, 2'-O-alila, 2'-fluoro- ou 2'-azido-ribose, análogos de açúcares carbocíclicos, açúcares □-anoméricos, açúcares epiméricos tais como arabinose, xiloses ou lixoses, açúcares piranose, açúcares furanose, sedoheptuloses, análogos acíclicos e análogos de nucleosídeos abásicos tais como metila ribosídeo. Uma ou mais ligações fosfodiéster podem ser substituídas por grupos de ligação alternativos. Estes grupos de ligação alternativos incluem, mas não estão limitados a, modalidades em que fosfato é substituído por P(O)S("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR_2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO ou CH_2 ("formacetal"), no qual cada R ou R' é de modo independente H ou alquila (1-20 C) substituído ou não substituído opcionalmente contendo uma

ligação éter (-O-) , arila, alquenila, cicloalquila, cicloalquenila ou araldila. Nem todas as ligações em um polinucleotídeo precisam ser idênticas. A descrição precedente se aplica a todos os polinucleotídeos referidos aqui, inclusive RNA e DNA.

Uma "região variável" de um anticorpo se refere à região variável da cadeia leve de anticorpo ou à região variável da cadeia pesada de anticorpo, ou sozinha ou em combinação. As regiões variáveis da cadeia pesada e leve consistem, cada uma, em quatro regiões de estrutura (FR) conectadas por três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) também conhecidas como regiões hipervariáveis. As CDRs em cada cadeia são mantidas juntas em íntima proximidade pelos FRs e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação antigênica de anticorpos. Há no mínimo duas técnicas para determinar CDRs: (1) uma abordagem à base de variabilidade de seqüência de espécies cruzadas (isto é, Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); e (2) uma abordagem à base de estudos cristalográficos de complexos antígeno-anticorpo (Chothia et al. (1989) *Nature* 342:877; Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Conforme usado aqui, uma CDR pode ser referir a CDRs definidas por qualquer abordagem ou por uma combinação de ambas as abordagens.

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

Conforme usado aqui, o termo "fator de crescimento nervoso" e "NGF" se refere a fator de crescimento nervoso e variantes do mesmo que conservam no mínimo parte da atividade biológica do NGF. Conforme usado aqui, NGF inclui todas as espécies mamíferas de NGF de seqüência nativa, inclusive humana, canina, felina, eqüina, ou bovina.

"Receptor de NGF" se refere a um polipeptídeo que é ligado por ou ativado por NGF. Receptores de NGF incluem o receptor TrkA e o receptor p75 de quaisquer espécies mamíferas, inclusive, mas não limitadas a, humana, canina, felina, eqüina, primata, ou bovina.

Conforme usado aqui, um "anticorpo antagonista anti-NGF" (de modo intercambiável denominado "anticorpo anti-NGF") se refere a um anticorpo o qual é capaz de ligar a NGF e inibir a atividade biológica do NGF e/ou um ou mais caminhos a jusante mediados por sinalização de NGF. Um anticorpo antagonista anti-NGF engloba anticorpos que bloqueiam, antagonizam, suprimem ou reduzem (inclusive significativamente) a atividade biológica do NGF, inclusive caminhos a jusante mediados por sinalização de NGF, tais como ligação de receptor e/ou provocação de uma reação celular a NGF. Para os fins da presente invenção, será explicitamente entendido que o termo "anticorpo antagonista anti-NGF" engloba todos os termos, títulos, e estados funcionais e características previamente identificados por meio dos quais o próprio NGF, uma biológica atividade de NGF (inclusive mas não limitada a sua capacidade para capacidade para mediaar qualquer aspecto de dor pós-cirúrgica), ou as conseqüências da atividade biológica, são substancialmente anulados, reduzidos, ou neutralizados em qualquer grau significativo. Em algumas modalidades, um anticorpo antagonista anti-NGF liga NGF e evita a dimerização de NGF e/ou ligação a um receptor de NGF (tal como p75 e/ou trkA). Em outras modalidades, um anticorpo anti-NGF liga NGF e evita a dimerização de receptor trkA e/ou autofosforilação de trkA. Exemplos de anticorpos antagonistas anti-NGF são proporcionados aqui.

"Atividade biológica" do NGF geralmente se refere à capacidade para ligar receptores de NGF e/ou ativar caminhos de sinalização de receptores de NGF. Sem limitação, uma atividade biológica inclui qualquer uma ou mais das seguintes: a capacidade para ligar um receptor de NGF (tal como p75 e/ou trkA); a capacidade para promover dimerização de receptores trkA e/ou autofosforilação; a capacidade para ativar um caminho de sinalização de receptores de NGF; a capacidade para promover diferenciação celular, proliferação, sobrevida, crescimento e outras alterações na fisiologia celular, inclusive alteração (no caso de neurônios, inclusive neurônio periférico e central) na morfologia neuronal, sinaptogênese, função sináptica, liberação de neurotransmissores e/ou neuropeptídeos e regeneração depois de lesão;

a capacidade para promover sobrevida de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo; e a capacidade para mediar dor, inclusive dor pós-cirúrgica.

Conforme usado aqui, "substancialmente puro" se refere a material o qual é no mínimo 50% puro (isto é, livre e contaminantes), mais preferencialmente no mínimo 90 % puro, mais preferencialmente no mínimo 95% puro, mais preferencialmente no mínimo 98% puro, mais preferencialmente no mínimo 99% puro.

Uma "célula hospedeira" inclui um célula individual ou cultura celular que pode ser ou tenha sido um receptor para um ou mais vetores para incorporação de insertos de polinucleotídeos. Células hospedeiras incluem progênie de uma única célula hospedeira, e a progênie pode não ser necessariamente completamente idêntica (em morfologia ou em complemento de DNA genômico) à célula original matriz devido a mutação natural, acidental, ou deliberada. Uma célula hospedeira inclui células transfectadas in vivo com um ou mais polinucleotídeos desta invenção.

Conforme usado aqui, "tratamento" é uma abordagem para obter resultados clínicos benéficos ou desejados. Para os fins desta invenção, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados a, um ou mais dos seguintes : melhora ou alívio de qualquer aspecto de dor, inclusive dor aguda, crônica, inflamatória, neuropática, dor pós-cirúrgica, dor da artrite reumatóide, ou dor de osteoartrite. Para os fins desta invenção, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados a, um ou mais dos seguintes : inclusive redução da gravidade, alívio de um ou mais sintomas associados com dor inclusive qualquer aspecto de dor (tal como encurtamento da duração da dor, redução da sensibilidade ou sensação de dor).

Uma "quantidade eficaz" de fármaco, composto, ou composição farmacêutica é uma quantidade suficiente para efetuar resultados benéficos ou desejados inclusive resultados clínicos tais como alívio ou redução na sensação da dor. Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações. Para os fins desta invenção, uma quantidade eficaz de fármaco, composto, ou composição farmacêutica é uma quantidade suficien-

te para tratar, melhorar, reduzir a intensidade de e/ou prevenir dor, inclusive dor pós-cirúrgica, dor da artrite reumatóide, e/ou dor de osteoartrite. Em algumas modalidades, a "quantidade eficaz" pode reduzir dor em repouso (dor estacionária) ou dor induzida mecanicamente (inclusive dor depois de movimento), ou ambos, e pode ser administrada antes, durante ou depois de uma incisão, corte, rasgo ou lesão e/ou antes, durante ou depois de estímulo doloroso. Conforme é entendido no contexto clínico, uma quantidade eficaz de um fármaco, composto, ou composição farmacêutica pode ou não ser obtida em combinação com outro fármaco, composto, ou composição farmacêutica. Portanto, uma "quantidade eficaz" pode ser considerada no contexto de administrar um ou mais agentes terapêuticos, e um único agente pode ser considerado para ser administrado em uma quantidade eficaz caso, em combiknação com um ou mais agentes diversos, possa ser obtido ou seja obtido um resultado desejável.

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

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

"Aliviar" uma dor ou um ou mais sintomas de uma dor (tal como

dor da artrite reumatóide ou dor de osteoartrite) significa reduzir a extensão de uma ou mais manifestações clínicas indesejáveis de dor pós-cirúrgica em um indivíduo ou população de indivíduos tratados com um anticorpo antagonista anti-NGF de acordo com a invenção.

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

"Dor" conforme usado aqui, se refere a dor de qualquer etiologia, inclusive dor aguda e crônica, e qualquer dor com um componente inflamatório. Exemplos de dor incluem dor pós-cirúrgica, dor do pós-operatório (inclusive dor dental), enxaqueca, cefaléia e nevralgia trigeminal, dor associada a queimadura, ferimento ou pedra renal, dor associada a trauma (inclusive lesão traumática da cabeça), dor neuropática, dor associada a distúrbios músculo-esqueléticos tais como artrite reumatóide, osteoartrite, espondilite anquilosante, artropatias soro-negativas (não-reumatóides), reumatismo não articular e distúrbios peri-articulares, e dor associada a câncer (inclusive "dor de ruptura" e dor associada a câncer terminal), neuropatia periférica e nevralgia pós-herpética. Exemplos de dor com um componente inflamatório (além de algumas das descritas acima) incluem dor reumática, dor associada a mucosite, e dismenorréia.

"Dor pós-cirúrgica" (denominada de modo intercambiável "dor pós-incisional" ou "dor pós-traumática") se refere a dor originária ou resultan-

te de um trauma externo tal como um corte, punção, incisão, dilaceramento, ou ferimento em tecido de um indivíduo (inclusive a que surge de todos os procedimentos cirúrgicos, quer invasiva ou não invasiva). Conforme usado aqui, dor pós-cirúrgica não inclui dor que ocorre (surge ou se origina) sem um trauma físico externo. Em algumas modalidades, dor pós-cirúrgica é dor interna ou externa (inclusive periférica), e o ferimento, corte, trauma, dilaceramento ou incisão pode ocorrer acidentalmente (como com um ferimento traumático) ou deliberadamente (como com uma incisão cirúrgica). Conforme usado aqui, "dor" inclui nocicepção e a sensação de dor, e a dor pode ser avaliada objetivamente e subjetivamente, usando escores de dor e outros métodos de conhecimento geral na técnica. Dor pós-cirúrgica, conforme usado aqui, inclui alodinia (isto é, aumento da reação a um estímulo normalmente não nocivo) e hiperalgesia (isto é, aumento da reação a um estímulo normalmente nocivo ou desagradável), que por sua vez, pode ser de natureza térmica ou mecânica (táctila). Em algumas modalidades, a dor se caracteriza por sensibilidade térmica, sensibilidade mecânica e/ou dor em repouso. Em algumas modalidades, a dor pós-cirúrgica compreende dor induzida mecanicamente ou dor em repouso. Em outras modalidades, a dor pós-cirúrgica compreende dor em repouso. A dor pode ser dor primária ou secundária, conforme é de conhecimento geral na técnica.

Uma "amostra biológica" engloba uma variedade de tipos de amostras obtidas de um indivíduo e pode ser usada em um ensaio de diagnóstico ou de monitoramento. A definição engloba amostras de sangue e outros líquidos de origem biológica, amostras de tecidos sólidos tais como uma amostra de biópsia ou culturas de tecidos ou células derivadas dos mesmos, e a progênie dos mesmos. A definição também inclui amostras que foram manipuladas em qualquer modo depois de sua aquisição, tal como por tratamento com reagentes, solubilização, ou enriquecimento para alguns componentes, tais como proteínas ou polinucleotídeos, ou embutindo em uma matriz sólida ou semi-sólida para fins de seccionamento. O termo "amostra biológica" engloba uma amostra clínica, também inclui células em cultura, sobrenadantes celulares, lisados celulares, soro, plasma, fluido bio-

lógico, e amostras de tecido.

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

Conforme usado aqui, "vetor" significa um construto, o qual é capaz de liberar, e preferencialmente expressar, um ou mais genes ou uma ou mais seqüências de interesse em uma célula hospedeira. Exemplos de vetores incluem, mas não estão limitados a, vetores virais, vetores de expressão de RNA ou DNA nu, plasmídeo, vetores de cosmídeo ou fago, vetores de expressão de DNA ou RNA associados a agentes de condensação catiônicos, vetores de expressão de DNA ou RNA encapsulados em lipossomas, e algumas células eucarióticas, tais como células produtoras.

Conforme usado aqui, "seqüência controle de expressão" significa uma seqüência de ácido nucléico que orienta a transcrição de um ácido nucléico. Uma seqüência controle de expressão pode ser um promotor, tal como um promotor constitutivo ou um indutível, ou um intensificador. A seqüência controle de expressão é encadeada operavelmente à seqüência de ácido nucléico a ser transcrita.

Conforme usado aqui, "veículo farmaceuticamente aceitável" inclui qualquer material o qual, quando combinado com um ingrediente ativo, permite que o ingrediente conserve a atividade biológica e seja não-reativo com o sistema imune do sujeito. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, quaisquer dos veículos farmacêuticos de padrão tais como uma solução salina tamponada com fosfato, água, emulsões tais como emulsão de óleo / água, e vários tipos de agentes umectantes. Diluentes preferenciais para administração aerosol ou parenteral são solução salina tamponada com fosfato ou solução salina normal (0,9%). Composições compreendendo os veículos referidos são formulados por métodos convencionais de conhecimento geral (veja, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; e Remington,

The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000).

O termo "koff", conforme usado aqui, pretende se referir à constante de *off rate* para dissociação de um anticorpo do complexo antígeno/anticorpo.

O termo "Kd", conforme usado aqui, pretende se referir à constante de dissociação de uma interação antígeno/anticorpo.

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

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

Esta invenção engloba composições, inclusive composições farmacêuticas, compreendendo um anticorpo ou polipeptídeo de E3; e polinucleotídeos compreendendo seqüências codificando um anticorpo ou polipeptídeo de E3. Conforme usado aqui, as composições compreendem um ou mais anticorpos ou polipeptídeos (os quais podem ser ou não um anticorpo) que ligam a NGF, e/ou um ou mais polinucleotídeos compreendendo seqüências codificando um ou mais anticorpos ou polipeptídeos que ligam a NGF. Estas composições podem compreender adicionalmente excipientes adequados, tais como excipientes farmaceuticamente aceitáveis inclusive tampões, os quais são de conhecimento geral na técnica.

A invenção também engloba modalidades de anticorpo, polipeptídeo e polinucleotídeo isolados. A invenção também engloba modalidades de anticorpo, polipeptídeo e polinucleotídeo substancialmente puros.

Os anticorpos e polipeptídeos da invenção são caracterizados por qualquer uma (uma ou mais) das seguintes características: (a) capacidade para ligar a NGF; (b) capacidade para reduzir e/ou inibir a atividade biológica de NGF e/ou um ou mais caminhos a jusante mediados por sinalização de NGF; (c) capacidade para reduzir e/ou inibir a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo; (d) ausência de qualquer reatividade cruzada significativa a NT3, NT4/5, e/ou BDNF; (e) capacidade para tratar e/ou prevenir dor (inclusive dor pós-cirúrgica); (f) capacidade para aumentar o clearance de NGF;

(g) capacidade para reduzir ou inibir a ativação de receptor de trkA, conforme detectado, por exemplo, usando ensaio de ativação de receptor de quinase (KIRA) (veja a Patente dos Estados Unidos No. 6.027.927).

As propriedades de ligação do anticorpo E3, o qual liga NGF humano com alta afinidade e cinética de dissociação lenta, comparado com anticorpo anti-NGF monoclonal murino de origem 911, são resumidas abaixo. E3 liga NGF humano com uma afinidade de ligação cerca de 50 vezes maior do que o anticorpo de camundongo de origem 911.

anticorpo	k_D	"koff"	K_{on}
911 (Fab)	3,7 nM	$9x10^{-5}s^{-1}$	$2.2x10^{4}M^{-1}s^{-1}$
E3 (Fab)	0,07 nM	$<4x10^{-5}s^{-1}$	$6x10^{5}M^{-1}s^{-1}$

O anticorpo E3 e anticorpos relacionados também apresentam uma forte capacidade para antagonizar NGF humano, conforme avaliado por ensaios in vitro (veja os Exemplos 2 e 3). Por exemplo, o anticorpo E3 antagoniza a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de neurônios trigeminais E13 de camundongo em uma IC50 de cerca de 21 pM na presença de 15 pM de NGF humano, e cerca de 1,2 pM na presença de 1,5 pM de NGF humano.

Por conseguinte, em outro aspecto, os anticorpos e polipeptídeos da invenção são adicionalmente identificados e caracterizados por: (h) alta afinidade de ligação a NGF humano com baixa cinética de dissociação (em algumas modalidades, com uma K_D de menos de cerca de 2 nM, e/ou uma "koff" de mais lento do que cerca de 6x10-5 s-1) e/ou (i) capacidade para inibir (bloquear) a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 100 pM ou menos a cerca de 15 pM de NGF (em algumas modalidades, NGF humano) e/ou uma IC50 de cerca de 20 pM ou menos a cerca de 1,5 pM de NGF.

Em algumas modalidades, o anticorpo liga NGF humano, e não liga significativamente um NGF de outra espécie de vertebrado (em alguma modalidade, mamífero). Em algumas modalidades, o anticorpo liga NGF humano bem como um ou mais NGF de outra espécie de vertebrado (em

algumas modalidades, mamífero). Em ainda outras modalidades, o anticorpo liga NGF e não tem reação cruzada significativamente com outras neurotrofinas (tais como as neurotrofinas relacionadas, NT3, NT4/5, e/ou BDNF). Em algumas modalidades, o anticorpo liga NGF bem como no mínimo uma outra neurotrofina. Em algumas modalidades, o anticorpo liga a uma espécie mamífera de NGF, tal como cavalo ou cachorro, mas não liga significativamente a NGF de outra espécie mamífera.

Em algumas modalidades, a invenção é um anticorpo compreendendo uma cadeia leve que é codificada por um polinucleotídeo que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC No. PTA-4893 ou ATCC No. PTA-4894. Em outro aspecto, a invenção é um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que é codificada por um polinucleotídeo que é produzido por uma célula hospedeira com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895. A presente invenção também engloba várias formulações de E3 e fragmentos de anticorpos equivalentes (por exemplo, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, Fc, etc.), cadeia única (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão compreendendo uma porção anticorpo, e qualquer outra configuração modificada de E3 qaue compreende um sítio de reconhecimento antigênico (NGF) da especificidade requirida. Os anticorpos equivalentes de E3, inclusive fragmentos de anticorpos e de polipeptídeos (os quais podem ser ou não anticorpos) de E3, e polipeptídeos compreendendo fragmentos de polipeptídeos de E3 são identificados e caracterizador por quaisquer (um ou mais) dos critérios descritos acima.

Por conseguinte, a invenção proporciona quaisquer dos seguintes, ou composições (inclusive composições farmacêuticas) compreendendo quaisquer dos seguintes: (a) anticorpo E3; (b) um fragmento ou uma região do anticorpo E3; (c) uma cadeia leve do anticorpo E3 conforme mostrado nas Figuras 1B; (c) uma cadeia pesada do anticorpo E3 conforme mostrado nas Figuras 1A; (d) uma ou mais regiões variázveis de uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada do anticorpo E3; (e) uma ou mais CDRs (uma, duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs) do anticorpo E3 mostradas nas Figuras 1A e 1B; (f) CDR H3 da cadeia pesada do anticorpo E3 mostrada na figura 1A;

(g) CDR L3 da cadeia leve do anticorpo E3 mostrada na Figura 1B; (h) três CDRs da cadeia leve do anticorpo E3 mostrada na Figura 1B; (i) três CDRs da cadeia pesada do anticorpo E3 mostrada na Figura 1A; (j) três CDRs da cadeia leve e três CDRs da cadeia pesada, do anticorpo E3 mostrada nas Figuras 1A e 1B; e (k) um anticorpo compreendendo qualquer um de (b) a (j). Conforme é evidente a partir da descrição aqui, especificamente excluídas da invenção estão modalidades de polipeptídeos consistindo na seqüência de aminoácidos idêntica a uma seqüência de aminoácidos de anticorpo monoclonal de camundongo, 911. As seqüências de CDR estendidas de Mab 911 são mostradas nas Figuras 1A e 1B, e na SEQ ID NOS: 9-14.

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

Em algumas modalidades, a invenção proporciona um anticorpo o qual compreende no mínimo uma CDR que é substancialmente homóloga a no mínimo uma CDR, no mínimo duas, no mínimo três, no mínimo quatro, no mínimo 5 CDRs de E3 (ou, em algumas modalidades substancialmente homóloga a todas as 6 CDRs de E3, ou derivados de E3). Outras modalidades incluem anticorpos os quais têm no mínimo duas, três, quatro, cinco, ou seis CDR(s) que são substancialmente homólogas a no mínimo duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs de E3 ou derivados de E3. Entende-se que, para

os fins desta invenção, especificidade de ligação e/ou atividade global (a qual pode ser em termos de tratar e/ou prevenir dor ou inibir a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de neurônios trigeminais de camundongo E13.5) é geralmente conservada, embora a extensão da atividade possa variar comparada com E3 (pode ser maior ou menor).

A invenção também proporciona um polipeptídeo (o qual pode ser ou não um anticorpo) o qual compreende uma seqüência de aminoácidos de E3 (mostrada nas Figuras 1A e 1B) que tem quaisquer dos seguintes: no mínimo 5 aminoácidos contíguos, no mínimo 8 aminoácidos contíguos, no mínimo cerca de 10 aminoácidos contíguos, no mínimo cerca de 15 aminoácidos contíguos, no mínimo cerca de 20 aminoácidos contíguos, no mínimo cerca de 25 aminoácidos contíguos, no mínimo cerca de 30 aminoácidos contíguos de uma seqüência de E3, em que no mínimo 3 dos aminoácidos são de uma região variável de E3, com o entendimento de que modalidades que consistem na seqüência de aminoácidos idêntica a uma seqüência de aminoácidos de anticorpo monoclonal dee camundongo, 911, são especificamente excluídas. As seqüências de CDR estendidas de Mab 911 são mostradas nas Figuras 1A e 1B, e nas SEQ ID NOS: 9-14. Em uma modalidade, a região variável é de uma cadeia leve de E3. Em outra modalidade, a região variável é de uma cadeia pesada de E3. Em outra modalidade, os 5 (ou mais) aminoácidos contíguos são de uma região determinante de complementaridade (CDR) de E3 mostrada nas Figuras 1A e 1B.

Em outra modalidade, a invenção proporciona um polipeptídeo o qual compreende uma seqüência de aminoácidos de E3 que tem quaisquer dos seguintes: no mínimo 5 aminoácidos contíguos, no mínimo 8 aminoácidos contíguos, no mínimo cerca de 10 aminoácidos contíguos, no mínimo cerca de 15 aminoácidos contíguos, no mínimo cerca de 20 aminoácidos contíguos, no mínimo cerca de 25 aminoácidos contíguos, no mínimo cerca de 30 aminoácidos contíguos de uma seqüência de E3, em que a seqüência de E3 compreende qualquer um ou mais de: resíduo aminoácido L29 de CDRH1, I50 de CDRH2, W101 de CDRH3, e/ou A103 de CDRH3; e/ou resíduo aminoácido S28 de CDRL1, N32 de CDRL1, T51 de CDRL2, 91E de

CDRL3 e/ou H92 de CDRL3, com o entendimento de que modalidades que consistem na seqüência de aminoácidos idêntica a uma seqüência de aminoácidos de anticorpo monoclonal de camundongo, 911, são especificamente excluídas.

Conforme é evidente, do início ao fim desta descoberta, é usado um esquema de numeração seqüencial de aminoácidos para referir a resíduos aminoácidos nas regiões variáveis (isto é, os resíduos aminoácidos em cada região variável são numerados em seqüência). Conforme é de conhecimento geral na técnica, os sistemas de numeração Kabat e/ou Chothia são úteis ao comparar dois anticorpos ou polipeptídeos, tais como um anticorpo E3 e uma variante de E3 (ou polipeptídeo suspeito de ser uma variante de E3). É de entendimento geral na técnica como converter numeração seqüencial para numeração Chothia e/ou Kabat, caso desejado, por exemplo, para uso para fazer comparações entre E3 e outro polipeptídeo. A Figura 23 representa as regiões variáveis E3 numeradas usando numeração seqüencial, Chothia e Kabat. Além disso, para facilitar a comparação, geralmente se entende que resíduos de estrutura geralmente, mas não sempre, têm aproximadamente o mesmo número de resíduos. No entanto, as CDRs podem variar de tamanho (isto é, é possível ter inserções e/ou eliminações de um ou mais resíduos aminoácidos). Ao comparar um anticorpo de E3 e um candidato variante de E3 (por exemplo, no caso de uma região CDR de uma seqüência candidata a qual é mais longa na seqüência no anticorpo E3 ao qual está alinhada), pode-se seguir as seguintes etapas (embora outros métodos sejam conhecidos na técnica). A seqüência de anticorpos candidata é alinhada com regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve de anticorpo E3. O alinhamento pode ser feito manualmente, ou por computador usando programas de computador comumente aceitos. O alinhamento pode ser facilitado usando alguns resíduos aminoácidos os quais são comuns às maiorias das seqüências Fab. Por exemplo, as cadeias leve e pesada tipicamente têm cada duas cisteínas, as quais são encontradas em uma posição conservada. Entende-se que a seqüência de aminoácidos de um anticorpo variante candidato pode ser mais longa (isto é, ter resíduos aminoáci-

dos inseridos) ou mais curta (ter resíduos aminoácidos eliminados). Sufixos podem ser adicionados ao número do resíduo para indicar a inserção de resíduos adicionais, por exemplo, resíduo 34 abc. Para seqüências candidatas as quais, por exemplo, alinham com uma seqüência de E3 para, por exemplo, resíduos 33 e 35, mas não têm nenhum resíduo entre estes para alinhar com o resíduo 35, o resíduo 35 é simplesmente não atribuído a um resíduo. Em outra abordagem, geralmente é de conhecimento geral que pode ser feita comparação entre aminoácidos equivalentes estruturais (por exemplo, mesma posição no complexo antígeno-anticorpo) ao comparar CDRs de diferentes extensões. Por exemplo, a numeração Chothia (Al-Lazikani et al, supra) geralmente (mas não em todos os casos), coloca inserções e eliminações nas posições estruturalmente corretas. A equivalência estrutural também pode ser deduzida ou demonstrada usando cristalografia de raios X ou análise de ciclo mutante duplo (veja Pons et al. (1999) Prot. Sci. 8:958-968).

A afinidade de ligação de um anticorpo anti-NGF a NGF (tal como hNGF) pode ser cerca de 0,10 até cerca de 0,80 nM, cerca de 0,15 até cerca de 0,75 nM e cerca de 0,18 até cerca de 0,72 nM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é cerca de 2 pM, cerca de 5 pM, cerca de 10 pM, cerca de 15 pM, cerca de 20 pM, cerca de 40 pM, ou mais de cerca de 40 pM. Em uma modalidade, a afinidade de ligação é entre about cerca de 2 pM e 22 pM. Em outras modalidades, a afinidade de ligação é menos de cerca de 10 nM, cerca de 5 nM, cerca de 4 nM, cerca de 3.5 nM, cerca de 3 nM, cerca de 2.5 nM, cerca de 2 nM, cerca de 1.5 nM, cerca de 1 nM, cerca de 900 pM, cerca de 800 pM, cerca de 700 pM, cerca de 600 pM, cerca de 500 pM, cerca de 400 pM, cerca de 300 pM, cerca de 200 pM, cerca de 150 pM, cerca de 100 pM, cerca de 90 pM, cerca de 80 pM, cerca de 70 pM, cerca de 60 pM, cerca de 50 pM, cerca de 40 pM, cerca de 30 pM, cerca de 10 pM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é cerca de 10 nM. Em outras modalidades, a afinidade de ligação é menos de cerca de 10 nM. Em outras modalidades, a afinidade de ligação é cerca de 0,1 nM ou cerca de 0,07 nM. Em outras modalidades, a afinidade de ligação é menos de cerca

de 0,1 nM ou menos de cerca de 0,07 nM. Em outras modalidades, a afinidade de ligação é qualquer de cerca de 10 nM, cerca de 5 nM, cerca de 4 nM, cerca de 3.5 nM, cerca de 3 nM, cerca de 2.5 nM, cerca de 2 nM, cerca de 1.5 nM, cerca de 1 nM, cerca de 900 pM, cerca de 800 pM, bout 700 pM, cerca de 600 pM, cerca de 500 pM, cerca de 400 pM, cerca de 300 pM, cerca de 200 pM, cerca de 150 pM, cerca de 100 pM, cerca de 90 pM, cerca de 80 pM, cerca de 70 pM, cerca de 60 pM, cerca de 50 pM, cerca de 40 pM, cerca de 30 pM, cerca de 10 pM to any de cerca de 2 pM, cerca de 5 pM, cerca de 10 pM, cerca de 15 pM, cerca de 20 pM, ou cerca de 40 pM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é qualquer de cerca de 10 nM, cerca de 5 nM, cerca de 4 nM, cerca de 3,5 nM, cerca de 3 nM, cerca de 2,5 nM, cerca de 2 nM, cerca de 1,5 nM, cerca de 1 nM, cerca de 900 pM, cerca de 800 pM, cerca de 700 pM, cerca de 600 pM, cerca de 500 pM, cerca de 400 pM, cerca de 300 pM, cerca de 200 pM, cerca de 150 pM, cerca de 100 pM, cerca de 90 pM, cerca de 80 pM, cerca de 70 pM, cerca de 60 pM, cerca de 50 pM, cerca de 40 pM, cerca de 30 pM, cerca de 10 pM. Em ainda outras modalidades, a afinidade de ligação é cerca de 2 pM, cerca de 5 pM, cerca de 10 pM, cerca de 15 pM, cerca de 20 pM, cerca de 40 pM, ou mais de cerca de 40 pM.

A afinidade de ligação do anticorpo a NGF pode ser determinada usando métodos de conhecimento geral na técnica. Um modo para determinar a afinidade de ligação dos anticorpos a NGF é medindo a afinidade de fragmentos Fab monofuncionais do anticorpo, conforme descrito nos Exemplos. Para obter fragmentos Fab monofuncionais, um anticorpo (por exemplo, IgG) pode ser clivado com papaína ou expressado de modo recombinante. A afinidade de um fragmento Fab anti-NGF de um anticorpo pode ser determinada por ressonância de plasmon superficial (sistema de ressonância de plasmon superficial BIAcore3000™ (SPR), BIAcore, INC, Piscataway NJ), conforme descrito nos Exemplos. Este protocolo é adequado para uso na determinação da afinidade de ligação de um anticorpo a NGF de qualquer espécie, inclusive NGF humano, NGF de outro vertebrado (em algumas modalidades, mamífero) (tal como NGF de camundongo, NGF de rato, NGF de

primata), bem como para uso com outras neurotrofinas, tais como as neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5, e/ou BDNF.

Em algumas modalidades, os anticorpos ou peptídeos da invenção podem inibir (reduzir, e/ou bloquear) a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM, ou menos. Em algumas modalidades, os anticorpos ou peptídeos da invenção podem inibr (reduzir, e/ou bloquear) a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 (na presença de cerca de 1.5 pM de NGF) de cerca de qualquer de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM, ou menos. Em algumas modalidades, os anticorpos ou peptídeos da invenção podem inibir (reduzir, e/ou bloquear) a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de rato de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 (na presença de cerca de 15 pM de NGF) de cerca de qualquer de 150 pM, 125 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, ou menos. Em algumas modalidades, os anticorpos ou peptídeos da invenção podem inibir (reduzir, e/ou bloquear) a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de rato de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 (na presença de cerca de 1,5 pM de NGF) de cerca de qualquer de 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM, ou menos. Métodos para medição da sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de neurônios trigeminais E13 de camundongo são conhecidos na técnica, e descritos, por exemplo, no Exemplo 2.

A invenção também proporciona métodos para preparar quaisquer destes anticorpos ou polipeptídeos. Os anticorpos desta invenção podem ser preparados por procedimentos conhecidos na técnica, alguns dos quais são ilustrados nos Exemplos. Os polipeptídeos podem ser produzidos por degradação proteolítica ou diversa dos anticorpos, por métodos recombinantes (isto é, polipeptídeos únicos ou de fusão) conforme descrito acima ou por síntese química. Polipeptídeos dos anticorpos, especialmente poli-

peptídeos mais curtos até cerca de 50 aminoácidos, são preparados convenientemente por síntese química. Métodos de síntese química são conhecidos na técnica e estão disponíveis comercialmente. Por exemplo, um anticorpo E3 pode ser produzido por um sintetizador de polipeptídeos automatizado empregando o método de fase sólida. Veja também, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.807.715; 4.816.567; e 6.331.415. Anticorpos quiméricos ou híbridos também podem ser preparados in vitro usando métodos conhecidos de química de proteínas sintéticas, inclusive aqueles envolvendo agentes de reticulação. Por exemplo, imunotoxinas podem ser construídas usando uma reação de permuta dissulfeto ou formando uma ligação tioéter. Exemplos de reagentes adequados para este fim incluem iminotiolato e metila-4-mercaptobutirimidato.

Em outra alternativa, os anticorpos podem ser preparados de modo recombinante usando procedimentos que são de conhecimento geral na técnica. Em uma modalidade, um polinucleotídeo compreendendo uma seqüência codificando as regiões de cadeia leve e variável do anticorpo E3 (mostradas nas Figuras 1A e 1B) é clonado em um vetor para expresão ou propagação em uma célula hospedeira (por exemplo, células CHO). Em outra modalidade, as seqüências de polinucleotídeos mostradas nas Figuras 2 e 3 são clonadas em um ou mais vetores para expresão ou propagação. A seqüência codificando o anticorpo de interesse pode ser mantida em um vetor em uma célula hospedeira e a célula hospedeira pode ser então expandida e congelada para uso futuro. Vetores (inclusive vetores de expressão) e células hospedeiras são adicionalmente descritas aqui. Foram descritos métodos para expressar anticorpos de modo recombinantem em plantas ou leite. Veja, por exemplo, Peeters et al. (2001) Vaccine 19:2756; Lonberg, N. and D. Huszar (1995) Int.Rev.Immunol 13:65; e Pollock et al. (1999) J Immunol Methods 231:147. São conhecidos na técnica métodos para preparar derivados de anticorpos, por exemplo, humanizados, de cadeia única, e etc.

A invenção também engloba fragmentos de região variável de cadeia única ("scFv") de anticorpos desta invenção, tais como E3. Fragmentos de região variável de cadeia única são preparados encadeando regiões

variáveis de cadeia leve e/ou pesada usando um peptídeo de ligação curto. Bird et al. (1988) Science 242:423-426. Um exemplo de um peptídeo de ligação é (GGGGS)3 (SEQ ID NO: 15), o qual constrói ponte de cerca de 3,5 nm entre o término carbóxi de uma região variável e o término amino da outra região variável. Ligantes de outras seqüências foram designados e usados (Bird et al. (1988)). Ligantes podem ser por sua vez modificados para funções adicionais, tais como fixação de fármacos ou fixação a suportes sólidos. As variantes de cadeia única podem ser produzidas ou de modo recombinante ou sinteticamente. Para produção sintética de scFv, pode ser usado um sintetizador automático. Para produção recombinante de scFv, pode ser introduzido um plasmídeo adequado contendo polinucleotídeo que codificam o scFv em uma célula hospedeira adequada, quer eucariótica, tal como células de levedura, vegetal, de inseto ou de mamífero, quer procariótica, tal como E. coli. Polinucleotídeos codificando o scFv de interesse podem ser preparados por manipulações de rotina tais como ligação de polinucleotídeos. O scFv resultante pode ser isolado usando técnicas de purificação de proteína de rotina conhecidas na arte.

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

O anticorpo pode ser um anticorpo biespecífico, um anticorpo monoclonal que tem especificidades de ligação para no mínimo dois antígenos diferentes. Um anticorpo biespecífico pode ser preparado usando os anticorpos descritos aqui. São conhecidos na técnica métodos para preparar anticorpos biespecíficos (veja, por exemplo, Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121:210). Tradicionalmente, a produção recombinante de anti-

corpos biespecíficos se baseou na coexpressão de dois pares de cadeias pesada-leve de imunoglobulina, com as duas cadeias pesadas tendo diferentes especificidades (Millstein and Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

De acordo com uma abordagem para preparar anticorpos biespecíficos, domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação antígeno-anticorpo) são fundidos a seqüências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão preferencialmente é com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo no mínimo parte da articulação, regiões CH2 e CH3. É preferencial ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1), contendo o sítio necessário para ligação de cadeia leve, presente em no mínimo uma das fusões. DNAs codificando as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, caso desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão isolados, e são cotransfectados em um organismo hospedeiro adequado. Isto proporciona grande flexibilidade em ajustar as proporções mútuas dos três fragmentos de polipeptídeos em modalidades quando proporções desiguais das três cadeias de polipeptídeos usadas na construção proporcionam as produções ótimas. No entanto, é possível inserir as seqüências codificantes para duas ou todas as três cadeias de polipeptídeos em um vetor de expressão quando a expressão de no mínimo duas cadeias de polipeptídeos em iguais proporções resulta em altas produções ou quando as proporções não são de importância particular.

Em uma abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação em um braço, e um par de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina híbrida (proporcionando uma segunda especificidade de ligação) em outro braço. Esta estrutura assimétrica, com uma cadeia leve de imunoglobulina em somente metade da molécula biespecífica, facilita a separação do composto biespecífico desejado de combinações de cadeias de imunoglobulina indesejadas. Esta abordagem é descrita na Publicação de Patente Internacional PCT No. WO 94/04690, publicada em 3 de março de 1994.

Anticorpos heteroconjugados, compreendendo dois anticorpos ligados de modo covalente, também estão dentro do âmbito da invenção. Os anticorpos referidos têm sido usados para ter por alvo células do sistema imune para células indesejadas (Patente dos Estados Unidos No. 4.676.980), e para tratamento de infecção por HIV (publicação do pedido de patente PCT Nos. WO 91/00360 e WO 92/200373; EP 03089). Anticorpos heteroconjugados podem ser preparados usando quaisquer métodos de reticulação convenientes. Agentes e técnicas de reticulação adequados são de conhecimento geral na técnica, e são descritos na Patente dos Estados Unidos No. 4.676.980.

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

Anticorpos podem ser modificados conforme descrito na Publicação de Patente Internacional PCT No. WO 99/58572, publicada em 18 de novembro de 1999. Estes anticorpos compreendem, além de um domínio de ligação dirigido na molécula alvo, um domínio efetor tendo uma seqüência de aminoácidos substancialmente homóloga ao todo ou parte de um domínio constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina humana. Estes anticorpos são capazes de ligar a molécula alvo sem iniciar um processo de lise dependente de complemento significante, ou destruição, mediada por células, do alvo. Preferencialmente, o domínio efetor é capaz de ligar especificamente FcRn e/ou FcγRIIb. Estes são tipicamente à base de domínios quiméricos derivados de dois ou mais domínios CH2 de cadeia pesada de imunoglobulina humana. Anticorpos modificados nesta maneira são preferenciais para uso em terapia crônica com anticorpos, para evitar reações adversas inflamatórias e diversas a terapia com anticorpo convencional.

A invenção engloba modificações para o anticorpo E3, inclusive anticorpos funcionalmente equivalentes os quais não afetam significativamente suas propriedades e variantes as quais têm atividade aumentada ou reduzida. A modificação de polipeptídeos é prática de rotina na técnica e é adicionalmente exemplificada nos Exemplos. Exemplos de polipeptídeos modificados incluem polipeptídeos com substituições (inclusive substituições

conservativas) de resíduos aminoácidos, uma ou mais eliminações ou adições de aminoácidos as quais não alteram prejudicialmente de modo significativo a atividade funcional, ou uso de análogos químicos.

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

Variantes de seqüências de aminoácidos dos anticorpos podem ser preparadas introduzindo alterações de nucleotídeos apropriadas no DNA do anticorpo, ou por síntese de peptídeo. As variantes referidas incluem, por exemplo, eliminações de, e/ou inserções em e/ou substituições de, resíduos dentro das seqüências de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ou 2 descritas aqui. Qualquer combinação de eliminação, inserção, e substituição é feita para chegar ao constructo final, contanto que o constructo final possua as características desejadas. As alterações de aminoácidos também podem alterar processos pós-translacionais do anticorpo, tais como alterar o número ou a posição de sítios de glicosilação.

Um método útila para identificação de alguns resíduos ou regiões do anticorpo que são localizações preferenciais para mutagênese ou modificação é denominado "mutagênese de varredura de alanina," e é descrito por Cunningham and Wells, 1989, Science, 244:1081-1085. Um resíduo ou grupo de resíduos alvo é identificado (por exemplo, resíduos carregados tais como arg, asp, his, lys, e glu) e substituído por um aminoácido neutro ou negativamente carregado (ainda mais preferencialmente alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com antígeno. As localizações

de aminoácidos demonstrando sensibilidade funcional para as substituições são em seguida refinadas introduzindo variantes adicionais ou diversas em, ou para, os sítios de substituição. Portanto, enquanto é predeterminado o sítio para introduzir uma variação de seqüência de aminoácidos, a natureza da mutação per se não precisa ser predeterminada. Por exemplo, para analisar a performance de uma mutação um dado sítio, é conduzida mutagênese aleatória ou de varredura ala na região ou códon alvo e as variantes de anticorpos expressadas são triadas para a atividade desejada. Mutagênese de varredura de biblioteca, conforme descrito aqui, também pode ser usada para identificar localizações em um anticorpo que são adequadas para mutagênese ou modificação.

Inserções de seqüências de aminoácidos incluem fusões de terminal amino e/ou carboxila variando em extensão de um resíduo até polipeptídeos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-seqüência de resíduos aminoácidos únicos ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionila N-terminal ou o anticorpo fundido a uma etiqueta de epitopo. Outras variantes insercionais da molécula de anticorpo incluem a fusão ao N- ou C-término do anticorpo de uma enzima ou um polipeptídeo o qual aumenta a meia-vida sérica do anticorpo.

Substituições variantes têm no mínimo um resíduo aminoácido na molécula do anticorpo removido e um resíduo diferente inserido em seu local. Os sítios de maior interesse para mutagênese substitucional incluem as regiões hipervariáveis, mas alterações de FR também são contempladas. Substituições conservativas são mostradas na Tabela 1 sob o título de "substituições conservativas". Se as referidas substituições resultam em uma alteração na atividade biológica, então alterações mais substanciais, denominadas "substituições típicas" na Tabela 1, ou conforme adicionalmente descrito abaixo em referência a classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos triados.

Tabela 1: Substituições de Aminoácidos

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

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

(1) Hidrofóbicos: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) Hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr;

(3) Acídicos: Asp, Glu;

(4) Básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

(5) Resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro; e

(6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Substituições não-conservativas são feitas permutando um membro de uma destas classes por outra classe.

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

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

Modificações também incluem polipeptídeos glicosilados e não glicosilados, bem como polipeptídeos com outras modificações pós-translacionais, tais como, por exemplo, glicosilação com açúcares diferentes, acetilação, e fosforilação. Anticorpos são glicosilados em posições conservadas em suas regiões constantes (Jefferis and Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright and Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). As cadeias laterais de oligossacarídeos das imunoglobulinas afetam a função das proteínas (Boyd et al., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180) e a interação intramolecular entre porções da glicoproteína, as quais podem afetar a conformação e a superfície tridimensional apresentada da glicoproteína (Hefferis and Lund, supra; Wyss and

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

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

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

O padrão de glicosilação dos anticorpos também pode ser alterado sem alterar a seqüência de nucleotídeos subjacente. A glicosilação depende em grande parte da célula hospedeira usada para expressar o anticorpo. Como o tipo de célula usada para expressão de glicoproteínas recombinantes, por exemplo, anticorpos, como terapêuticos potenciais é raramente a célula nativa, podem ser esperadas variações no padrão de glicosi-

lação dos anticorpos (veja, por exemplo, Hse et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070).

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

Outros métodos de modificação incluem usar técnicas de ligação conhecidas na técnica, inclusive, mas não limitadas a, meios enzimáticos, substituição oxidativa e quelação. Pode ser usadas modificações, por exemplo, para fixação de rótulos para imunoensaio. Polipeptídeos E3 modificados são fabricados usando procedimentos estabelecidos na técnica e podem ser triados usando ensaios de de torina conhecidas na técnica, algumas das quais são descritos abaixo e nos Exemplos.

Outras modificações de anticorpo incluem anticorpos que foram modificados conforme descrito na Publicação de Patente Internacional No. WO 99/58572, publicada em 18 de novembro de 1999. Estes anticorpos compreendem, além de um domínio de ligação dirigido na molécula alvo, um domínio efetor tendo uma seqüência de aminoácidos substancialmente homóloga a todo ou parte de um domínio constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina humana. Estes anticorpos têm a capacidade de ligar a molécula alvo sem iniciar um processo de lise dependente do complemento significante, ou destruição do alvo mediada por células. Em algumas modalidades, o domínio efetor tem a capacidade de ligar especificamente FcRn e/ou

FcγRIIb. Estes são tipicamente à base de domínios quiméricos derivados de dois ou mais domínios CH2 de cadeia pesada de imunoglobulina humana. Anticorpos modificados desta maneira são particularmente adequados para uso em terapia crônica com anticorpos, para evitar reações adversas inflamatórias e diversas a terapia convencional com anticorpos.

A invenção também engloba proteínas de fusão compreendendo um ou mais fragmentos ou regiões dos anticorpos (tais como E3) ou polipeptídeos desta invenção. Em uma modalidade, é proporcionado um polipeptídeo de fusão que compreende no mínimo 10 aminoácidos contíguos da região de cadeia leve variável mostrada na Figura 1B e/ou no mínimo 10 aminoácidos da região de cadeia pesada variável mostrada na Figura 1A. Em outra modalidade, o polipeptídeo de fusão compreende uma região variável de cadeia leve e/ou uma região variável de cadeia pesada de E3, conforme mostrado nas Figuras 1A e 1B. Em outra modalidade, o polipeptídeo de fusão compreende uma ou mais CDRs de E3. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo de fusão compreende CDR H3 e/ou CDR L3 do anticorpo E3. Em outra modalidade, o polipeptídeo de fusão compreende qualquer um ou mais de: resíduo aminoácido L29 de CDRH1, I50 de CDRH2, W101 de CDRH3, e/ou A103 de CDRH3; e/ou resíduo aminoácido S28 de CDRL1, N32 de CDRL1, T51 de CDRL2, 91E de CDRL3 e/ou H92 de CDRL3. Para os fins desta invenção, uma proteína de fusão E3 contém um ou mais anticorpos E3 e outra seqüência de aminoácidos à qual não está fixada na molécula nativa, por exemplo, uma seqüência heteróloga ou uma seqüência homóloga de outra região. Seqüências heterólogas típicas incluem, mas não estão limitadas a uma "etiqueta" tal como uma etiqueta FLAG ou uma etiqueta 6His. Etiquetas são de conhecimento geral na técnica.

Um polipeptídeo de fusão E3 pode ser criado por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, sinteticamente ou recombinantemente. Tipicamente, as proteínas de fusão E3 desta invenção são feitas preparando e expressando um polinucleotídeo codificando as mesmas usando métodos recombinantes descritos aqui, embora estas também possam ser preparadas por outros meios conhecidos na técnica, inclusive, por exemplo, síntese

química.

Esta invenção também proporciona composições compreendendo anticorpos E3 ou polipeptídeos conjugados (por exemplo, ligados) a um agente que facilita ligação a um suporte sólido (tal como biotina ou avidina). Por simplicidade, será feita referência geralmente a E3 ou anticorpos com o entendimento de que estes métodos se aplicam a quaisquer das modalidades de ligação de NGF descritas aqui. conjugação se refere a ligação destes componentes conforme descrito aqui. A ligação (a qual é geralmente fixando estes componentes em próxima associação no mínimo para administração) pode ser realizada em qualquer número de modos. Por exemplo, é possível uma reação direta entre um agente e um anticorpo quando cada uma possui um substituinte capaz de reagir com o outro. Por exemplo, um grupo nucleofílico, tal como um grupo amina ou sulfidrila, por um lado pode ser capaz de reagir com um grupo contendo carbonila, tal como um anidrido ou um haleto ácido, ou com um grupo alquila contendo um bom grupo de partida (por exemplo, um haleto) pelo outro.

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

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

A invenção também proporciona composições (inclusive composições farmacêuticas) e kits compreendendo o anticorpo E3, e, conforme esta descoberta torna claro, qualquer um ou todos os anticorpos e/ou polipeptídeos descritos aqui.

Polinucleotídeos, vetores e células hospedeiras

A invenção também proporciona polinucleotídeos isolados codificando os anticorpos e polipeptídeos da invenção (inclusive um anticorpo compreendendo as seqüências de polipeptídeo da cadeia leve e regiões variáveis de cadeia pesada mostrada nas Figuras 1A e 1B), e vectores e células hospedeiras compreendendo o polinucleotídeo.

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

Em outro aspecto, a invenção é um polinucleotídeo isolado que codifica para uma cadeia leve de E3 com um número de depósito de ATCC No. PTA-4893 ou ATCC No. PTA-4894. Em outro aspecto, a invenção é um polinucleotídeo isolado que codifica para uma cadeia pesada de E3 com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895. Em ainda outro aspecto, a invenção é um polinucleotídeo isolado compreendendo (a) uma região variável codificada no polinucleotídeo com um número de depósito de ATCC No. PTA-4894 e (b) uma região variável codificada no polinucleotídeo com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895. Em outro aspecto, a invenção

é um polinucleotídeo isolado compreendendo (a) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleotídeo com um número de depósito de ATCC No. PTA-4894; e/ou (b) uma ou mais CDRs codificadas no polinucleotídeo com um número de depósito de ATCC No. PTA-4895.

Em outro aspecto, a invenção proporciona polinucleotídeos codificando quaisquer dos anticorpos (inclusive fragmentos de anticorpos) e polipeptídeos descritos aqui. Polinucleotídeos podem ser preparados por procedimentos conhecidos na técnica

Em outro aspecto, a invenção proporciona composições (tais como algumas composições farmacêuticas) compreendendo quaisquer dos polinucleotídeos da invenção. Em algumas modalidades, a composição compreende um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo codificando o anticorpo E3 conforme descrito aqui. Em outra modalidade, a composição compreende um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo codificando quaisquer dos anticorpos ou polipeptídeos descritos aqui. Em ainda outras modalidades, a composição compreende qualquer um ou ambos os polinucleotídeos mostrados nas Figuras 2 e 3. Vetores de expressão, e a administração de composições de polinucleotídeos são adicionalmente descritas aqui.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para preparar quaisquer dos polinucleotídeos descritos aqui.

Polinucleotídeos complementares a qualquer uma de semelhantes seqüências também são englobados pela presente invenção. Polinucleotídeos pode ser de filamento único (codificante ou anti-sentido) ou de filamento duplo, e podem ser moléculas de DNA (genômico, cDNA ou sintético) ou de RNA. Moléculas de RNA incluem moléculas HnRNA, as quais contêm íntrons e correspondem a uma molécula de DNA em uma maneira um-a-um, e moléculas de mRNA, as quais não contêm íntrons. Seqüências adicionais codificantes ou não codificantes podem, mas não precisam, estar presentes dentro de um polinucleotídeo da presente invenção, e um polinucleotídeo pode, mas não precisa, ser ligado a outras moléculas e/ou materiais de suporte.

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

Diz-se que duas seqüências de polinucleotídeo ou polipeptídeo são "idênticas" se a seqüência de nucleotídeos ou aminoácidos nas duas seqüências for a mesma quando alinhadas para máxima correspondência conforme descrito abaixo. As comparações entre duas seqüências são realizadas tipicamente comparando as seqüências sobre uma janela de comparação para identificar e comparar regiões locais de similaridade de seqüência. Uma "janela de comparação" conforme usado aqui, se refere a um segmento de no mínimo cerca de 20 posições contíguas, geralmente 30 até cerca de 75, 40 até cerca de 50, nas quais uma seqüência pode ser comparada com uma seqüência de referência do mesmo número de posições contíguas depois das duas seqüências serem alinhadas otimamente.

O alinhamento ótimo das seqüências para comparação pode ser conduzido usando o programa Megalign na suite do software de bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parâmetros *default*. Este programa incorpora vários esquemas de alinhamento descritos nas seguintes referências: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenes pp. 626-645 Methods in En-

zymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferencialmente, a "percentagem de identidade de seqüência" é determinada comparando duas seqüências otimamente alinhadas sobre uma janela de comparação de no mínimo 20 posições, em que a porção da seqüência de polipeptídeo ou polinucleotídeo na janela de comparação pode compreender adições ou eliminações (isto é *gaps*) de 20 por cento ou menos, geralmente 5 a 15 por cento, ou 10 a 12 por cento, comparadas com as seqüências de referência (as quais não compreendem adições ou eliminações) para ótimo alinhamento das duas seqüências. A percentagem é calculada determinando o número de posições nas quais as bases de ácido nucléico idênticas ou resíduo aminoácido ocorre em ambas as seqüências para produzir o número de posições combinadas, dividindo o número de posições combinadas pelo número total de posições na seqüência de referência (isto é o tamanho da janela) e multiplicando os resultados por 100 para produzir a percentagem de identidade de seqüência.

Variantes também, ou alternativamente, podem ser substancialmente homólogas a um gene nativo, ou uma porção ou complemento do mesmo. As variantes de polinucleotídeos referidas têm a capacidade de hibridizar sob condições moderadamente estringentes a uma seqüência de DNA que ocorre naturalmente codificando um anticorpo nativo (ou uma seqüência complementar).

"Condições moderadamente estringentes" adequadas incluem pré-lavagem em uma solução de 5 X SSC, 0,5% de SDS, 1,0 mM de EDTA (pH 8.0); hibridização a 50°C a 65°C, 5 X SSC, de um dia para o outro; seguida por lavagem duas vezes a 65°C por 20 minutos com cada de 2X, 0,5X e 0,2X SSC contendo 0, 1 % de SDS.

Conforme usado aqui, "condições altamente estringentes" ou "condições de alta estringência" são aquelas que: (1) empregam baixa força iônica e alta temperature para lavagem , por exemplo, 0,015 M de cloreto de sódio / 0,0015 M de citrato de sódio / 0,1% de dodecila sulfato de sódio a 50°C; (2) empregam durante hibridização um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, 50% (em v/v) de formamida com 0,1% de albumina sérica bovina / 0,1% de Ficoll / 0,1% de polivinilpirrolidona / 50 mM de tampão de fosfato de sódio a pH 6.5 com 750 mM de cloreto de sódio, 75 mM de citrato de sódio a 42°C; ou (3) empegam 50% de formamida, 5 x SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6.8), 0,1% de pirofosfato de sódio, 5 x solução de Denhardt, DNA de esperma de salmão sonicado (50 µg/ml), 0,1% de SDS, e 10% de sulfato de dextrano a 42°C, com lavagens a 42°C em 0,2 x SSC (cloreto de sódio / citrato de sódio) e 50% de formamida a 55°C, seguida por uma lavagem de alta estringência consistindo em 0,1 x SSC contendo EDTA a 55°C. O técnico versado reconhecerá como ajustar a temperatura, força iônica, e etc. conforme necessário para conciliar fatores tais como extensão a sonda e semelhantes.

Será reconhecido por aqueles versados na ténica que, em conseqüência da degeneração do código genético, existem muitas seqüências de nucleotídeos que codificam um polipeptídeo conforme descrito aqui. Alguns destes polinucleotídeos suportam homologia mínima com a seqüência de nucleotídeos d qualquer gene nativo. Não obstante, polinucleotídeos que variam devido a diferenças no uso de códons são especificamente contemplados pela presente invenção. Além disso, alelos dos genes compreendendo as seqüências de polinucleotídeos proporcionadas aqui, estão dentro do âmbito da presente invenção. Alelos são genes endógenos que são alterados em conseqüência de uma ou mais mutações, tais como eliminações, adições e/ou substituições de nucleotídeos. O mRNA e a proteína resultantes podem, mas não precisam, ter uma estrutura ou função alterada. Podem ser identificados alelos usando técnicas de rotina (tais como hibridização, amplificação e/ou comparação de seqüência com o banco de dados).

Os polinucleotídeos desta invenção podem ser obtidos usando

síntese química, métodos recombinantes, ou PCR. Métodos para síntese química de polinucleotídeo são de conhecimento geral na técnica e não precisam ser descritos em detalhes aqui. Uma pessoa evrsada na técnica pode usar as seqüências proporcionadas aqui, e um sintetizador de DNA comercial para producir uma seqüência de DNA desejada.

Para preparar polinucleotídeos usando métodos recombinantes, um polinucleotídeo compreendendo uma seqüência desejada pode ser inserido em um vetor adequdo, e o vetor por sua vez pode ser introduzido em uma célula hospedeira adequada para replicação e amplificação, conforme adicionalmente discutido aqui. Polinucleotídeos podem ser inseridos em células hospedeiras por qualquer meio conhecido na técnica. As células são transformadas introduzindo um polinucleotídeo exógeno por captação direta, endocitose, transfecção, "*F-mating*" ou eletroporação. Uma vez introduzido, o polinucleotídeo exógeno pode ser mantido dentro da célula como um vetor não integrado (tal como um plasmídeo) ou integrado no genoma da célula hospedeira. O polinucleotídeo amplificado deste modo pode ser isolado da célula hospedeira por métodos de conhecimento geral dentro da técnica. Veja, por exemplo, Sambrook et al. (1989).

Alternativamente, PCR permite a reprodução de seqüências de DNA. A tecnologia de PCR é de conhecimento geral na técnica e é descrita nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 e 4.683.202, bem como PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauswer Press, Boston (1994).

RNA pode ser obtido usando o DNA isolado em um vetor apropriado e inserindo o mesmo em uma célula hospedeira adequada. Quando a célula se duplica e o DNA é transcrito em RNA, o RNA pode ser então isolado usando métodos de conhecimento geral daqueles versados na técnica, conforme determinado em Sambrook et al., (1989), por exemplo.

Vetores de clonagem adequados podem ser construídos de acordo com técnicas de rotina, ou podem ser selecionados entre um grande número de vetores de clonagem disponível na técnica. Enquanto o vetor de clonagem selecionado pode variar de acordo com a célula hospedeira que

se pretende usar, vetores de clonagem úteis geralmente terão a capacidade para auto-duplicar, podem possuir um único alvo para uma endonuclease de restrição em particular, e/ou podem carregar genes para um marcador que pode ser usado na seleção de clones contendo o vetor. Exemplos adequados incluem plasmídeos e vírus bacterianos, por exemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por exemplo, pBS SK+) e seus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, fagos de DNAs, e vetores de vai-vém tais como pSA3 e pAT28. Estes e muitos outros vetores de clonagem estão disponíveis em vendedores comerciais tais como BioRad, Strategene, e Invitrogen.

Vetores de expressão geralmente são constructos de polinucleotídeo replicáveis que contêm um polinucleotídeo de acordo com a invenção. Está implícito que um vetor de expressão deve ser replicável nas células hospedeiras ou como episssomas ou como uma parte integral do DNA cromossômico. Vetores de expressão adequados incluem mas não estão limitados a plasmídeos, vetores virais, inclusive adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus, cosmídeos, e um ou mais vetores de expressão descritos em na Publicação de Patente Internacional PCT No. WO 87/04462. Os componentes vetoriais geralmente podem incluir, mas não estão limitados a, um ou mais dos seguintes: uma seqüência de sinal; uma origem de replicação; um ou mais genes marcadores; elementos de controle transcripcional adequados (tais como promotores, intensificadores e terminador). Para expressão (isto é, translação), também são geralmente requeridos um ou mais elementos de controle transcripcional, tais como sítios de ligação de ribossoma, sítios de iniciação de translação, e códons de parada.

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

A invenção também proporciona células hospedeiras compreendendo quaisquer dos polinucleotídeos descritos aqui. Quaisquer células hospedeiras capazes de superexpressar DNAs heterólogos podem ser usadas para a finalidade de isolar os genes codificando o anticorpo, polipeptídeo ou proteína de interesse. exemplos não-limitantes de células hospedeiras de mamíferos incluem, mas não estão limitados a células COS, HeLa, e CHO. Veja também a Publicação de Patente Internacional PCT No. WO 87/04462. Células hospedeiras não-mamíferas adequadas incluem procariotas (tais como E. coli ou B. subtillis) e levedura (tal como S. cerevisae, S. pombe; ou K. lactis). Preferencialmente, as células hospedeiras expressam os cDNAs em um nível de cerca de 5 vezes maior, mais preferencialmente 10 vezes maior, ainda mais preferencialmente 20 vezes maior do que o do anticorpo endógeno correspondente ou proteína de interesse, caso presente, nas células hospedeiras. A triagem das células hospedeiras para uma ligação específica a NGF é realizada por um imunoensaio ou FACS. Pode ser identificada uma célula superexpressando o anticorpo ou proteína de interesse.

Métodos usando E3 e anticorpos derivados de E3

Anticorpo E3 o qual liga NGF pode ser usado para identificar ou detectar a presença ou ausência de NGF. Por simplicidade, será feita referência de modo geral a E3 ou anticorpos com o entendimento de que estes métodos se aplicam a quaisquer das modalidades de ligação de NGF (tais como polipeptídeos) descritas aqui. Detecção geralmente envolve contactar uma amostra biológica com um anticorpo descrito aqui, que liga a NGF e a formação de um complexo entre NGF e um anticorpo (por exemplo, E3) o qual liga especificamente a NGF. A formação de um complexo semelhante pode ser in vitro ou in vivo. O termo "detecção" conforme usado aqui, inclui detecção qualitativa e/ou quantitativa (níveis de medição) com ou sem referência a um controle.

Pode ser usado para detecção qualquer um de uma variedade de métodos conhecidos, inclusive, mas não limitados a , imunoensaio, usando anticorpo que ligam o polipeptídeo, por exemplo, por ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e semelhantes; e

ensaio funcional para o polipeptídeo codificado, por exemplo, atividade de ligação ou ensaio enzimático. Em algumas modalidades, o anticorpo é rotulado de modo detectável.

Usos Diagnósticos do E3 e Derivados

Anticorpos e polipeptídeos da invenção podem ser usados na detecção, diagnóstico e monitoração de uma doença, condição, ou distúrbio associado a expressão de NGF alterada ou aberrante (em algumas modalidades, aumento ou redução da expressão de NGF (em relação a uma amostra normal), e/ou expressão inadequada, tal como presença de expressão em um ou mais tecidos e/ou uma ou mais células que normalmente carecem de expressão de NGF, ou ausência de expressão de NGF em um ou mais tecidos ou uma ou mais células que normalmente possuem expressão de NGF). Os anticorpos e polipeptídeos da invenção são adicionalmente úteis para detecção de expressão de NGF, por exemplo, em uma doença associada a sensibilidade ou responsividade ao NGF alterada ou aberrante. Em algumas modalidades, a expressão de NGF é detectada em uma amostra de um indivíduo suspeito de ter uma doença, distúrbio caracterizando ou associado a uma sensibilidade ou responsividade a expressão de NGF alterada ou aberrante expression (por exemplo, um câncer no qual NGF estimula crescimento e/ou metástase).

Portanto, em algumas modalidades, a invenção proporciona métodos compreendendo contactar um espécime (amostra) de um indivíduo suspeito de ter expressão de NGF alterada ou aberrante com um anticorpo ou polipeptídeo da invenção e determinar se o nível de NGF difere do nível de um espécime de controle ou de comparação. Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma arritmia cardíaca, doença de Alzheimer, e/ou disfunção autônoma.

Em outras modalidades, a invenção proporciona métodos compreendendo contactar um espécime (amostra) de um indivíduo e determinar o nível de expressão de NGF. Em algumas modalidades, o indivíduo é suspeito de ter uma doença, distúrbio caracterizado ou associado a uma sensibilidade ou responsividade a expressão de NGF alterada ou aberrante. Em

algumas modalidades, o indivíduo tem câncer pulmonar de células pequenas, câncer de mama, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma de ovário, carcinoma hepatocelular, ou melanoma.

Para aplicações de diagnóstico, o anticorpo tipicamente será rotulado com uma porção detectável inclusive mas não limitada a radioisótopos, etiquetas fluorescentes, e várias etiquetas de substratos enzimáticos. Métodos para conjugar etiquetas a um anticorpo são conhecidos na técnica. Em outras modalidades da invenção, anticorpos da invenção não precisam ser rotulados, e a presença dos mesmos pode ser detectada usando um anticorpo rotulado o qual liga aos anticorpos da invenção.

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

Os anticorpos também podem ser usados para ensaios de diagnóstico in vivo, tais como estudo por imagens in vivo. De modo geral, o anticorpo é rotulado com um radionuclideo (tal como 111In, 99Tc, 14C, 131I, 125I, ou 3H) de modo que as células ou tecido de interesse podem ser localizadas usando imunoscintiografia.

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

Métodos para usar E3 e derivados para fins terapêuticos

O anticorpo E3 é útila para reduzir e/ou bloquear a biológica atividade do NGF. Acredita-se que esta atividade antagonista seja útila no tratamento de condições patológicas associadas com produção endógena de NGF, tais como dor. Geralmente, nestas modalidades uma quantidade eficaz é administrada a um indivíduo. Por conseguinte, em um aspecto, a invenção proporciona um método para antagonizar a atividade biológica de NGF humano usando quaisquer dos polipeptídeos (inclusive anticorpos tais como anticorpo E3) descritos aqui. Em uma modalidade, o método compreende contactar o fator de crescimento nervoso humano com quaisquer dos poli-

peptídeos (inclusive anticorpo E3) descritos aqui, por meio do quê a atividade do fator de crescimento nervoso humano é antagonizada, reduzida, bloqueada, ou suprimida. Em ainda outra modalidade, a um indivíduo com dor (tal como dor pós-cirúrgica, ou dor da artrite reumatóide) é administrado tratamento com E3.

Por simplicidade, será feita referência de modo geral a E3 ou anticorpo com o entendimento de que estes métodos se aplicam a quaisquer dos polipeptídeos e anticorpos variantes E3 descritos aqui.

Podem ser usadas para administração várias formulações de E3 ou fragmentos de E3 (por exemplo, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, Fc, e etc.), tais como de cadeia única (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão compreendendo uma porção anticorpo, e qualquer outra configuração modificada de E3 que compreende um sítio de reconhecimento antigênico de NGF da especificidade requerida. Em algumas modalidades, anticorpos E3 ou várias formulações de E3 dos mesmos podem ser administrados puros. Em outras modalidades, E3 ou várias formulações de E3 (inclusive qualquer modalidade de composição descrita aqui) dos mesmos e um excipiente farmaceuticamente aceitável são administrados, e podem estar em várias formulações. Excipientes farmaceuticamente aceitáveis são conhecidos na técnica, e são substâncias relativamente inertes que facilitam a administração de uma substância farmacologicamente eficaz. Por exemplo, um excipiente pode dar forma ou consistência, ou agem como um diluente. Excipientes adequados incluem mas não estão limitados a agentes estabilizantes, agentes umectantes e emulsificantes, sais para variar a osmolaridade, agentes de encapsulação, tampões, e intensificadores de penetração na pele. Excipientes bem como formulações para liberação de fármacos parenterais e não parenterais são determinadas em Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

Em algumas modalidades, estes agentes são formuladas para administração por injeção (por exemplo, por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via subcutânea, por via intramuscular, e etc.), embora outras formas de administração (por exemplo, oral, via mucosa, através de inala-

ção, por via sublingual, e etc) também possam ser usadas. Por conseguinte, anticorpo E3 e equivalentes dos mesmos são preferencialmente combinados com veículos farmaceuticamente aceitável tais como salina, solução de Ringer, solução de dextrose, e semelhantes. O regime de dosagem em particular, isto é, dose, momento e repetição, dependerá do indivíduo em particular e do histórico médico do indivíduo. De modo geral, pode ser usada qualquer uma das doses seguintes: uma dose de no mínimo cerca de 50 mg/kg de peso corporal; no mínimo cerca de 10 mg/kg de peso corporal; no mínimo cerca de 3 mg/kg de peso corporal; no mínimo cerca de 1 mg/kg de peso corporal; no mínimo cerca de 750 µg/kg de peso corporal; no mínimo cerca de 500 µg/kg de peso corporal; no mínimo cerca de 250 ug/kg de peso corporal; no mínimo cerca de 100 µg /kg de peso corporal; no mínimo cerca de 50 µg /kg de peso corporal; no mínimo cerca de 10 ug /kg de peso corporal; no mínimo cerca de 1 µg/kg de peso corporal, ou menos, é administrado. Para administrações repetidas durante vários dias ou mais tempo, dependendo da condição, o tratamento é sustentado até ocorrer uma supressão desejada dos sintomas da doença. Um regime de dosagem típico compreende administrar uma dose inicial de cerca de 2 mg/kg, seguida por uma dose de manutenção semanal de cerca de 1 mg/kg do anticorpo anti-NGF, or seguida por uma dose de manutenção de cerca de 1 mg/kg a cada duas semanas. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis, dependendo do padrão de decomposição farmacocinética que o médico pretende obter. Considerações empíricas, tais como a meia-vida, geralmente contribuirão para a determinação da dosagem. O progresso desta terapia é facilmente monitorado por técnicas e ensaios convencionais.

Em alguns indivíduos, pode ser requerida mais de uma dose. A freqüência de administração pode ser determinada e ajustada durante o curso da terapia. Por exemplo, a freqüência de administração pode ser determinada e ajustada com base no tipo e gravidade da dor a ser tratada, se o agente for administrado para fins preventivos ou terapêuticos, terapia prévia, o histórico clínico do paciente e a resposta ao agente, e a critério do médico assistente. Tipicamente o médico administrará um anticorpo antagonista an-

ti-NGF (tal como E3), até ser atingida uma dosagem que obtém o resultado desejado. Em alguns casos, podem ser apropriadas formulações de liberção contínua sustentada de anticorpos E3. Várias formulações e dispositivos para obter liberção sustentada são conhecidas na técnica.

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

A administração de um anticorpo (tal como E3) ou polipeptídeo de acordo com o método na presente invenção pode ser contínua ou intermitente, dependendo, por exemplo, da condição fisiológica do receptor, se a finalidade da administração for terapêutica ou profilática, e outros fatores de conhecimento dos clínicos versados. A administração de um anticorpo pode ser essencialmente contínua durante um período de tempo pré-selecionado ou pode ser em uma série de dose espaçadas, por exemplo, ou antes, durante, ou depois do desenvolvimento de dor, antes, durante, antes e depois, durante e depois, ou antes, durante, e depois do desenvolvimento de dor. A administração pode ser antes, durante e/ou depois de ferimento, incisão, trauma, cirurgia, e qualquer outro evento provável de dar origem a dor pós-cirúrgica.

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

Em algumas modalidades, mais de um anticorpo ou polipeptídeo pode estar presente. Os anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais. As composições referidas podem conter no mínimo um, no mínimo dois, no mínimo três, no mínimo quatro, no mínimo cinco diferentes anticorpos. Uma mistura de anticorpos, conforme eles são freqüentemente denotados na téc-

nica, pode ser particularmente útila no tratamento de uma gama mais ampla de população de indivíduos.

Um polinucleotídeo codificando quaisquer dos anticorpos ou polipeptídeos da invenção (tais como anticorpo E3) também pode ser usado para liberação e expressão de quaisquer dos anticorpos ou polipeptídeos da invenção (tais como anticorpo E3) em uma célula desejada. É evidente que um vetor de expressão pode ser usado para orientar a expressão de um anticorpo ou polipeptídeo E3. O vetor de expressão pode ser administrado por quaisquer meios conhecidos na técnica, tais como por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via intramuscular, por via subcutânea, por via intratecal, por via intraventricular, por via oral, por via enteral, por via parenteral, por via intranasal, por via dérmica, por via sublingual, ou por inalação. Por exemplo, a administração de vetores de expressão inclui administração local ou sistêmica, inclusive injeção, administração oral, pistola de partículas ou administração cateterizada, e administração tópica. Uma pessoa versada na técnica está familiarizada com administração de vetores de expressão para obter expressão de uma proteína exógena in vivo. Veja, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 6.436.908; 6.413.942; e 6.376.471.

Também pode ser usada a liberação orientada de composições terapêuticas compreendendo um polinucleotídeo codificando quaisquer dos anticorpos ou polipeptídeos da invenção (tais como anticorpo E3). Técnicas de liberação de DNA mediada por receptores são descritas, por exemplo, em Findeis et al., *Trends Biotechnol.* (1993) 11:202; Chiou et al., *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer* (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1988) 263:621; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1994) 269:542; Zenke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) (1990) 87:3655; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1991) 266:338. Composições terapêuticas contendo um polinucleotídeo são administradas dentro de um alcance de cerca de 100 ng até cerca de 200 mg de DNA para administração local em um protocolo de terapia genética. Faixas de concentração de cerca de 500 ng até cerca de 50 mg, cerca de 1 μg até cerca de 2 mg, cerca de 5 μg até cerca de 500 μg, e cerca de 20 μg até cerca de 100 μg of DNA também podem ser

usadas durante um protocolo de terapia genética. Os polinucleotídeos terapêuticos e polipeptídeos da presente invenção podem ser liberados usando veículos de liberação genética. O veículo de liberação genética pode ser de origem viral ou não viral (vejak, de modo geral, Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1994) 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy* (1994) 5:845; Connelly, *Human Gene Therapy* (1995) 1:185; e Kaplitt, *Nature Genetics* (1994) 6:148). A expressão de semelhantes seqüências codificantes pode ser induzida usando promotores endógenos mamíferos ou heterólogos. A expressão da seqüência codificante pode ser ou constitutiva ou regulada.

Vetores à base de vírus para liberação de um polinucleotídeo desejado e expressão em uma célula desejada são de conhecimento geral na técnica. Veículos à base de virus típicos incluem, mas não estão limitados a, retrovírus recombinantes (veja, por exemplo, as Publicações de Patentes Internacionais Nos. WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5. 219.740; 4.777.127; a Patente da Reino Unido No. 2.200.651; e a Patente Européia EP No. 0 345 242), vetores à base de alfavírus (por exemplo, vetores de Sindbis vírus, Semliki forest vírus (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), Ross River vírus (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) e vírus da encefalite eqüina venezuelana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), e vetores de vírus adeno-associados (AAV) (veja, por exemplo, as Publicações de Patentes Internacionais Nos. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 e WO 95/00655). Também pode ser empregada a administração de DNA ligado a adenovírus morto conforme descrito em Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.

Também podem ser empregados veículos e métodos de liberação não viral, inclusive, mas não limitados a, DNA condensado policatiônico ligado ou não-ligado a adenovírus mortos sozinhos (veja, por exemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); DNA ligado a ligante (veja, por exemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); células de veículos de liberação de células eucarióticas (veja, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos No.

5.814.482; as Publicações de Patente Internacional PCT Nos. WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; e WO 97/42338) e neutralização de carga nucléica ou fusão com membranas celulares. Também pode ser empregado DNA nu. Métodos de introdução de DNA nu típicos são descritos na Publicação de Patente Internacional PCT No. WO 90/11092 e na Patente dos Estados Unidos No. 5.580.859. Lipossomas que podem agir como veículos de liberação genética são descritos na Patente dos Estados Unidos No. 5.422.120; nas Publicações de Patente Internacional PCT Nos. WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; e na Patente Européia EP NO. 0 524 968. Abordagens adicionais são descritas em Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411 e em Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581.

Com respeito a todos os métodos descritos aqui, referência a anticorpos antagonistas anti-NGF também incluem composições compreendendo um ou mais destes agentes. Estas composições podem compreender adicionalmente excipientes adequados, tais como excipientes farmaceuticamente aceitáveis inclusive tampões, os quais são de conhecimento geral na técnica. A presente invenção pode ser usada sozinha ou em combinação com outros métodos de tratamento convencionais.

MÉTODOS PARA USAR ANTICORPO ANTAGONISTA ANTI-NGF PARA TRATAR OU PREVENIR DOR DA ARTRITE REUMATÓIDE

Em alguns aspectos, a invenção proporciona métodos para tratar e/ou prevenir a dor da artrite reumatóide em indivíduos inclusive memíferos, tanto humanos quanto não humanos. Por conseguinte, em um aspecto, a invenção proporciona métodos para tratar a dor da artrite reumatóide em um indivíduo compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF. Anticorpos antagonistas anti-NGF são conhecidos na técnica e descritos aqui.

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para reduzir a incidência de, melhorar, suprimir, aliviar, e/ou retardar o início, o desenvolvimento ou a progressão da dor da artrite reumatóide em um indivíduo. Portanto, em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado antes do desenvolvimento de dor ou um episódio de dor em um in-

divíduo tendo artrite reumatóide.

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para tratar caquexia inflamatória (perda de peso) associada a artrite reumatóide em um indivíduo compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-NGF (Roubenoff et al., *Arthritis Rheum.* 40(3): 534-9 (1997); Roubenoff et al., *J. Clin. Invest.* 93(6):2379-86 (1994)).

O diagnóstico ou avaliação da dor da artrite reumatóide está bem estabelecido na técnica. A avaliação pode ser realizada com base em medidas conhecidos na técnica, tais como caracterização da dor no paciente usando várias escalas de dor. Veja, por exemplo, Katz et al, *Surg Clin North Am.* (1999) 79 (2):231-52; Caraceni et al. *J Pain Symptom Manage* (2002) 23(3):239-55. Também há escalas comumente usadas para medir o estado de doença tais como a escala do Colégio Americano de Reumatologia (ACR, American College of Rheumatology) (Felson, et al., *Arthritis and Rheumatism* (1993) 36(6):729-740), o Questionário de Avaliação de Saúde (HAQ, Health Assessment Questionnaire) (Fries, et al., (1982) *J. Rheumatol.* 9: 789-793), a Escala de Paulus (Paulus, et al., *Arthritis and Rheumatism* (1990) 33: 477-484), e a Escala da Medida do Impacto da Artrite (AIMS, Arthritis Impact Measure Scale) (Meenam, et al., *Arthritis and Rheumatology* (1982) 25: 1048-1053). Anticorpo antagonista anti-NGF pode ser administrado a um indivíduo através de qualquer via adequada. Exemplos de diferentes vias de administração são descritas aqui.

O alívio da dor pode ser caracterizado pelo curso de tempo do alívio. Por conseguinte, em algumas modalidades, o alívio da dor é observado dentro de cerca de 24 horas depois da administração de anticorpo antagonista anti-NGF. Em outras modalidades, o alívio da dor é observado dentro de cerca de 36, 48, 60, 72 horas ou 4 dias depois da administração de anticorpo antagonista anti-NGF. Em ainda outras modalidades, o alívio da dor é observado antes de observar uma indicação de melhora da condição inflamatória associada a artrite reumatóide. Em algumas modalidades, a freqüência e/ou a intensidade da dor é diminuída, e/ou a qualidade de vida dos que estão sofrendo da doença é aumentada.

Preparo e uso de antagonistas de NGF (inclusive anticorpos anti-NGF) para estes métodos são descritos nas seções abaixo ("antagonistas de NGF ", "Anticorpo antagonista anti-NGF"; "Outros antagonistas de NGF"; "Identificação de antagonistas de NGF (tais como anticorpos antagonistas anti-NGF)"; "Composições para uso nos métodos da invenção"; "Administração de um antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF)").

MÉTODOS PARA USAR ANTICORPO ANTAGONISTA ANTI-NGF PARA TRATAR OU PREVENIR DOR DE OSTEOARTRITE

Em alguns aspectos, a invenção proporciona métodos para tratar e/ou prevenir a dor de osteoartrite em indivíduos inclusive memíferos, tanto humanos quanto não humanos. Por conseguinte, em um aspecto, a invenção proporciona métodos para tratar a dor de osteoartrite em um indivíduo compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF). Antagonistas de NGF, inclusive anticorpos antagonistas anti-NGF, são conhecidos na técnica e descritos aqui.

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para reduzir a incidência de, melhorar, suprimir, aliviar, e/ou retardar o início, o desenvolvimento ou a progressão da dor de osteoartrite em um indivíduo compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF). Portanto, em algumas modalidades, o antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) é administrado antes do desenvolvimento de dor ou um episódio de dor em um indivíduo tendo osteoartrite.

O diagnóstico ou avaliação da dor de osteoartrite está bem estabelecido na técnica. A avaliação pode ser realizada com base em medidas conhecidas na técnica, tais como caracterização da dor do paciente usando várias escalas de dor. Veja, por exemplo, Katz et al, *Surg Clin North Am.* (1999) 79 (2):231-52; Caraceni et al. J Pain Symptom Manage (2002) 23(3):239-55. Por exemplo, pode ser empregada a WOMAC Ambulation Pain Scale (inclusive for, rigidez, e função física) e 100 mm Visual Analogue

Scale (VAS) para avaliar a dor e avaliar a resposta ao tratamento.

Antagonistas de NGF (tais como um anticorpo antagonista anti-NGF) podem ser administrados a um indivíduo através de qualquer via adequada. Exemplos de diferentes via de administração são descritos aqui.

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

O alívio da dor pode ser caracterizado pelo curso de tempo do alívio. Por conseguinte, em algumas modalidades, o alívio da dor é observado dentro de cerca de 24 horas depois da administração de uma antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF). Em outras modalidades, o alívio da dor é observado dentro de cerca de 36, 48, 60, 72 horas ou 4 dias depois da administração do antagonista de NGF (tal como o anticorpo antagonista anti-NGF). Em algumas modalidades, a freqüência e/ou a intensidade da dor é diminuída, e/ou a é aumentada qualidade de vida daqueles sofrendo da doença. Em algumas modalidades, o alívio da dor para osteoartrite é proprcionado por duração de no mínimo cerca de 7 dias, no mínimo cerca de 14 dias, no mínimo cerca de 21 dias, no mínimo cerca de 28 dias, no mínimo cerca de 35 dias, no mínimo cerca de 42 dias, no mínimo cerca de 49 dias, no mínimo cerca de 56 dias, no mínimo cerca de 63 dias, no mínimo cerca de 70 dias, no mínimo cerca de 77 dias, no mínimo cerca de 84 dias, no mínimo cerca de 180 dias, ou mais depois de uma única dose do antagonista de NGF (tal como o anticorpo antagonista anti-NGF).

Preparo e uso de antagonistas de NGF (inclusive anticorpos anti-NGF) para estes métodos são descritos nas seções abaixo ("antagonistas de NGF ", "Anticorpo antagonista anti-NGF"; "Outros antagonistas de NGF"; "Identificação de antagonistas de NGF (tais como anticorpos antagonistas anti-NGF)"; "Composições para uso nos métodos da invenção"; "Administração de um antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF)").

Antagonistas de NGF

Os métodos da invenção (relativos a dor da artrite reumatóide e dor de osteoartrite) usam um antagonista de NGF, o qual se refere a qualquer molécula que bloqueia, suprime ou reduz (inclusive significativamente) a atividade biológica do NGF, inclusive caminhos a jusante mediados por sinalização de NGF, tais como ligação de receptores e/ou provocação de uma reação celular a NGF. O termo "antagonista" não implica qualquer mecanismo específico de ação biológica, e considera-se que inclui expressamente e engloba todas as interações possíveis farmacológicas, fisiológicas, e bioquímicas com NGF e suas conseqüências as quais podem ser obtidas por uma variedade de composições diferentes e quimicamente divergentes. Antagonistas de NGF típicos incluem, mas não estão limitados a, um anticorpo anti-NGF, uma molécula anti-sentido dirigida para NGF (inclusive uma molécula anti-sentido dirigida para um ácido nucléico codificando NGF), uma molécula anti-sentido dirigida para receptor de NGF (tal como TrkA receptor e/ou p75 receptor) (inclusive uma molécula anti-sentido dirigida para um ácido nucléico codificando TrkA e/ou p75), um composto inibidor de NGF, um análogo estrutural de NGF, uma mutação dominante-negativa de um TrkA receptor que liga um NGF, uma imunoadesina TrkA, um anticorpo anti-TrkA, uma mutação dominante-negativa de um p75 receptor que liga um NGF, um anticorpo anti-p75, e um inibidor de quinase. Para os fins da presente invenção, será explicitamente entendido que o termo "antagonista" engloba todos os termos, títulos, e estados funcionais previamente identificados e características por meio dos quais o próprio NGF, uma atividade biológica de NGF (inclusive mas não limitada a sua capacidade para mediar qualquer aspecto

de dor), ou as conseqüências da atividade biológica, são substancialmente anuladas, reduzidas, ou neutralizadas em qualquer grau significativo. Em algumas modalidades, um antagonista de NGF (por exemplo, um anticorpo) liga (interage fisicamente com) NGF, liga a um receptor de NGF (tal como TrkA receptor e/ou p75 receptor), e/ou reduz (impede e/ou bloqueia) a sinalização de receptores de NGF a jusante. Por conseguinte, em algumas modalidades, um antagonista de NGF liga (interage fisicamente com) NGF. Em algumas modalidades, o antagonista de NGF é um polipeptídeo o qual liga a NGF. Em algumas modalidades, o antagonista de NGF é um peptídeo ou um peptídeo modificado (tal como peptídeo de ligação de NGF fundido a um domínio Fc) descrito na Publicação de Patente Internacional PCT No. WO 2004/026329. Em outra modalidade, um antagonista de NGF liga a um receptor de NGF (tal como trkA receptor ou p75). Em outras modalidades, um antagonista de NGF reduz (impede e/ou bloqueia) a sinalização de receptores de NGF a jusante (por exemplo, inibidores de sinalização de quinase). Em outras modalidades, um antagonista de NGF inibe (reduz) a síntese e/ou liberação de NGF. Em outra modalidade, o antagonista de NGF é um antagonista de NGF que não é uma imunoadesina TrkA (isto é, é diferente de uma imunoadesina TrkA). Em outra modalidade, o antagonista de NGF é diferente de um anticorpo anti-NGF. Em outra modalidade, o antagonista de NGF é diferente de uma imunoadesina TrkA e diferente de um anticorpo anti-NGF. Em algumas modalidades, o antagonista de NGF liga NGF (tal como hNGF) e não liga significativamente a neurotrofinas relacionadas, tais como NT-3, NT4/5, e/ou BDNF. Em algumas modalidades, o antagonista de NGF não está associado a uma reação imune adversa. Em outras modalidades, o antagonista de NGF é um anticorpo anti-NGF. Em ainda outras modalidades, o anticorpo anti-NGF é humanizado (tal como anticorpo E3 descrito aqui). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-NGF é anticorpo E3 (conforme descrito aqui). Em outras modalidades, o anticorpo anti-NGF compreende uma ou mais CDRs do anticorpo E3 (tais como uma, duas, três, quatro, cinco, ou, em algumas modalidades, todas as seis CDRs de E3). Em outras modalidades, o anticorpo é humano. Em ainda outras modalidades, o anti-

corpo anti-NGF compreende a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada mostrada na Figura 1A (SEQ ID NO: 1) e a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia leve mostrada na Figura 1B (SEQ ID NO: 2). Em ainda outras modalidades, o anticorpo compreende uma região constante modificada, tal como uma região constante que é imunologicamente inerte, por exemplo, não inicia um processo de lise mediada pelo complemento, ou não estimula citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependentes (ADCC). Em outras modalidades, a região constante é modificada conforme descrito em Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; Pedido de Patente Internacional No. PCT/GB99/01441; e/ou Pedido de Patente do Reino Unido No. 9809951.8.

Anticorpo antagonista anti-NGF

Os métodos da invenção (relativos a dor da artrite reumatóide e dor de osteoartrite) usam um anticorpo antagonista anti-NGF, o qual se refere a qualquer molécula de anticorpo que bloqueia, suprime ou reduz (inclusive significativamente) a atividade biológica do NGF, inclusive caminhos a jusante mediados por sinalização de NGF, tais como ligação de receptores e/ou provocação de uma reação celular a NGF.

Um anticorpo antagonista anti-NGF deve apresentar qualquer uma ou mais das seguintes características: (a) ligam a NGF e inibem a atividade biológica de NGF ou caminhos a jusante mediados por função de sinalização de NGF; (b) previnem, melhoram, ou tratam qualquer aspecto de dor da artrite reumatóide ou dor de osteoartrite; (c) bloqueiam ou reduzem ativação de receptores de NGF (inclusive dimerização e/ou autofosforilação de TrkA receptor); (d) aumentam o clearance de NGF; (e) inibem (reduzem) a síntese, produção ou liberação de NGF. Anticorpos antagonistas anti-NGF são conhecidos na técnica, veja, por exemplo, a Publicação de Patente Internacional Nos. WO 01/78698, WO 01/64247, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.844.092, 5.877.016, e 6.153.189; Hongo et al., Hybridoma, 19:215-227 (2000); Cell. Molec. Biol. 13:559-568 (1993); Acesso no GenBank Nos. U39608, U39609, L17078, ou L17077. Anticorpos antagonistas anti-NGF e polipeptídeos também são descritos na Publicação de Patente

Internacional No. WO 2005/019266.

Para os fins desta invenção, o anticorpo reage com NGF em uma maneira que inibe NGF e/ou caminhos a jusante mediados pela função de sinalização de NGF. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-NGF reconhece NGF humano. Em ainda outras modalidades, o anticorpo antagonista anti-NGF especificamente liga NGF humano. Em alguma modalidade, o anticorpo antagonista anti-NGF não liga significativamente a neurotrofinas relacionadas, tais como NT-3, NT4/5, e/ou BDNF. Em ainda outras modalidades, o anticorpo anti-NGF é capaz de ligar NGF e inibir de modo eficaz a ligação de NGF a seu TrkA e/ou p75 receptor in vivo e/ou inibir de modo eficaz a ativação por NGF de seu TrkA e/ou p75 receptor. Em ainda outras modalidades, o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo monoclonal. Em ainda outras modalidades, o anticorpo anti-NGF é humanizado (tal como anticorpo E3 descritos aqui). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-NGF é humano. Veja, por exemplo, a publicação de Patente Internacional No. WO 2005/019266. Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo humano o qual reconhece um ou mais epitopos sobre NGF humanp. Em outra modalidade, o anticorpo é um anticorpo de camundongo ou de rato o qual reconhece um ou mais epitopos sobre NGF humano. Em outra modalidade, o anticorpo reconhece um ou mais epitopos sobre um NGF selecionado entre o grupo consistindo em: primata, canino, felino, eqüino, e bovino. Em ainda modalidades adicionais, o anticorpo antagonista anti-NGF liga essencialmente o mesmo NGF epitopo 6 como um anticorpo selecionado entre qualquer um ou mais dos seguintes: MAb 911, MAb 912 e MAb 938 (Veja Hongo, et al., Hybridoma 19:215-227 (2000)). Em outras modalidades, o anticorpo liga o mesmo epitopo como Mab 911. Em outra modalidade, o anticorpo compreende uma região constante que é imunologicamente inerte (por exemplo, não inicia um processo de lise mediada pelo complemento ou citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependentes (ADCC)). A atividade de ADCC pode ser avaliada usando métodos descrito na Patente dos Estados Unidos N.. 5. 500. 362. Em algumas modalidades, a região constante é modificada conforme descrito em *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624;

Pedido de Patente Internacional No. PCT/GB99/01441; e/ou Pedido de Patente do Reino Unido No. 9809951.8.

Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo anti-NGF monoclonal de camundongo humanizado denominado anticorpo "E3", quaisquer dos anticorpos relacionados com E3 descritos aqui, ou qualquer fragmentos dos mesmos, os quais são antagonistas de NGF.

Os anticorpos úteis na presente invenção podem englobar anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, fragmentos de anticorpos (por exemplo, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, Fc, etc.), anticorpos quiméricos, anticorpos biespecíficos, anticorpos heteroconjugados, cadeia única (ScFv), mutantes dos mesmos, proteínas de fusão compreendendo um porção anticorpo, anticorpos humanizados, e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreende um sítio de reconhecimento antigênico da especificidade requerida, inclusive variantes de glicosilação de anticorpos, seqüência de aminoácidos variantes de anticorpos, e anticorpos modificados de modo covalente. Os anticorpos podem ser murinos, de rato, humano, ou de qualquer outra origem (inclusive quiméricos ou anticorpos humanizados).

A afinidade de ligação de um anticorpo antagonista anti-NGF a NGF (tal como hNGF) pode ser cerca de 0,10 até cerca de 0,80 nM, cerca de 0,15 até cerca de 0,75 nM e cerca de 0,18 até cerca de 0,72 nM. Em uma modalidade, a afinidade de ligação é entre cerca de cerca de 2 pM and 22 pM. Em uma modalidade, a afinidade de ligação é entre em torno de cerca de 23 pM e cerca de 100 pM. Em uma modalidade, a afinidade de ligação é cerca de 10 nM. Em outras modalidades, a afinidade de ligação é menos de cerca de 10 nM. Em outras modalidades, a afinidade de ligação é cerca de 0,1 nM ou cerca de 0,07 nM. Em outras modalidades, a afinidade de ligação é menos de cerca de 0,1 nM ou menos de cerca de 0,07 nM. Em outras modalidades, a afinidade de ligação é qualquer uma de cerca de 100 nM, cerca de 50 nM, cerca de 10 nM, cerca de 1 nM, cerca de 500 pM, cerca de 100 pM, ou cerca de 50 pM to any de cerca de 2 pM, cerca de 5 pM, cerca de 10

pM, cerca de 15 pM, cerca de 20 pM, ou cerca de 40 pM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é qualquer uma de cerca de 100 nM, cerca de 50 nM, cerca de 10 nM, cerca de 1 nM, cerca de 500 pM, cerca de 100 pM, ou cerca de 50 pM, or menos de cerca de 50 pM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é menos de qualquer uma de cerca de 100 nM, cerca de 50 nM, cerca de 10 nM, cerca de 1 nM, cerca de 500 pM, cerca de 100 pM, ou cerca de 50 pM. Em ainda outras modalidades, a afinidade de ligação é cerca de 2 pM, cerca de 5 pM, cerca de 10 pM, cerca de 15 pM, cerca de 20 pM, cerca de 40 pM, ou mais de cerca de 40 pM.

Um modo para determinar a afinidade de ligação de anticorpos ao NGF é medindo a afinidade de ligação de fragmentos Fab monofuncionais do anticorpo. Para obter fragmentos Fab monofuncionais, um anticorpo (por exemplo, IgG) pode ser clivado com papaína ou expressado de modo recombinante. A afinidade de um fragmento Fab anti-NGF de um anticorpo pode ser determinada por ressonância de plasmon superficial (sistema de ressonância de plasmon superficial BIAcore3000™ (SPR), BIAcore, INC, Piscaway NJ). Chips de CM5 podem ser ativados com cloridreto de N-etila-N'-(3-dimetilaminopropila)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. NGF humano (ou qualquer outro NGF) pode ser diluído em acetato de sódio a 10 mM pH 4.0 e injetado sobre o chip ativado em uma concentração de 0,005 mg/mL. Usando tempo de fluxo variável através dos canais dos chips individuais, podem ser obtidas duas faixas de densidade antigênica : 100-200 unidades de resposar (RU) para estudos cinéticos detalhados e 500-600 RU para ensaios de triagem. O chip pode ser bloqueado com etanolamina. Estudos de regeneração mostraram que uma mistura de tampão de elutriação de Pierce (Product No. 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) e NaCl a 4 M (2:1) remove de modo eficaz o Fab ligado ao mesmo tempo que mantendo a atividade de hNGF sobre o chip por mais de 200 injeções. Tampão HBS-EP (HEPES a 0,01 M, pH 7.4, 0,15 NaCl, EDTA a 3 mM, 0,005% de Surfactant P29) é usado como tampão de funcionamento para os ensaios BIAcore. Diluições seriais (0,1-10x K_D estimada) de amostras de Fab purificado são injetadas por 1

min a 100 ⊠L/min e são permitidos tempos de dissociação de até 2h. As concentrações das proteínas Fab são determinadas por ELISA e/ou eletroforese SDS-PAGE usando um Fab de concentração conhecida (determinado por análise de aminoácidos) como um padrão. Índices de associação cinética (kon) e índices de dissociação ("koff") são obtidos simultaneamente ajustando os dados para um modelo de ligação de Langmuir a 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) usando o programa BIAevaluation. Os valores das constantes de dissociação de equilíbrio (K_D) são calculados como "koff"/k_{on}. Este protocolo é adequada para uso na determinação da afinidade de ligação de um anticorpo a qualquer NGF, inclusive NGF humano, NGF de outro vertebrado (em algumas modalidades, mamífero) (tal como NGF de camundongo, NGF de rato, NGF de primata), bem como para uso com outras neurotrofinas, tais como as neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5, e/ou BDNF.

Em algumas modalidades, o anticorpo liga NGF humano, e não liga significativamente um NGF de outra espécie de vertebrado (em algumas modalidades, mamífero). Em algumas modalidades, o anticorpo liga NGF humano bem como um ou mais NGF de outra espécie de vertebrado (em algumas modalidades, mamífero). Em ainda outras modalidades, o anticorpo liga NGF e não tem reação cruzada significativamente com outras neurotrofinas (tais como as neurotrofinas relacionadas, NT3, NT4/5, e/ou BDNF). Em algumas modalidades, o anticorpo liga NGF bem como no mínimo uma neurotrofina diversa. Em algumas modalidades, o anticorpo liga a uma espécie de NGF de mamífero, tal como cavalo ou cão, mas não liga significativamente a NGF de outra espécie de mamífero.

O um ou mais epitopos podem ser contínuos ou descontínuos. Em uma modalidade, o anticorpo liga essencialmente os mesmos epitopos de hNGF que um anticorpo selecionado entre o grupo consistindo em MAb 911, MAb 912, e MAb 938 conforme descrito em Hongo et al., Hybridoma, 19:215-227 (2000). Em outra modalidade, o anticorpo liga essencialmente o mesmo epitopo de hNGF que MAb 911. Em ainda outra modalidade, o anticorpo liga essencialmente o mesmo epitopo que MAb 909. Hongo et al., su-

pra. Por exemplo, o epitopo pode compreender um ou mais de: resíduos K32, K34 e E35 dentro da região variável 1 (aminoácidos 23-35) de hNGF; resíduos F79 e T81 dentro da região variável 4 (aminoácidos 81-88) de hNGF; resíduos H84 e K88 dentro da região variável 4; resíduo R103 entre a região variável 5 (aminoácidos 94-98) de hNGF e o C-término (aminoácidos 111-118) de hNGF; resíduo E11 dentro da região pré-variável 1 (aminoácidos 10-23) de hNGF; Y52 entre a região variável 2 (aminoácidos 40-49) de hNGF e a região variável 3 (aminoácidos 59-66) de hNGF; resíduos L112 e S113 dentro do C-término de hNGF; resíduos R59 e R69 dentro da região variável 3 de hNGF; ou resíduos V18, V20, e G23 dentro da região pré-variável 1 de hNGF. Além disso, um epitopo pode compreender uma ou mais entre a região variável 1, a região variável 3, a região variável 4, a região variável 5, a região de N-término, e/ou o C-término de hNGF. Em ainda outra modalidade, o anticorpo reduz significativamente a acessibilidade a solvente do resíduo R103 de hNGF. Entende-se que embora os epitopos descritos acima se refiram a NGF humano, uma pessoa de conhecimento regular pode alinhar as estruturas de NGF humano com o NGF de outra espécie e identificar complementos prováveis para estes epitopos.

Em um aspecto, anticorpos (por exemplo, humanos, humanizados, de camundongo, quiméricos) que podem inibir NGF podem ser preparados usando imunogênios que expressam seqüência de NGF de extensão total ou parcial. Em outro aspecto, pode ser usado um imunogênio compreendendo uma célula que superexpressa NGF. Outro exemplo de um imunogênio que pode ser usado é proteína de NGF que contém NGF de extensão total ou uma porção da proteína de NGF.

Os anticorpos antagonistas anti-NGF podem ser preparados por qualquer método conhecido na técnica. A via e esquema de imunização do animal hospedeiro são de modo geral acompanhando técnicas estabelecidas e convencionais para estimulação e produção de anticorpos, conforme adicionalmente descrito aqui. Técnicas gerais para produção de anticorpos humanos e de camundongo são conhecidos na técnica e são descritas aqui.

É contemplado que qualquer indivíduo mamífero inclusive seres

humanos ou células dos mesmos produtoras de anticorpos podem ser manipulados para servir como a base para a produção de linhagens celulares de hibridoma, mamífero, inclusive humano. Tipicamente, o animal hospedeiro é inoculado por via intraperitoneal, por via intramuscular, por via oral, por via subcutânea, intraplantar, e/ou por via intradérmica com uma quantidade de imunogênio, inclusive conforme descrito aqui.

Hibridomas podem ser preparados a partir dos linfócitos e de células de mieloma imortalizadas usando a técnica de hibridização de células somáticas geral de Kohler, B. e Milstein, C. (1975) Nature 256:495-497 ou conforme modificado por Buck, D. W., et al., In Vitro, 18:377-381 (1982). Linhagens de mieloma disponíveis, inclusive mas não limitadas a X63-Ag8.653 e as do Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EUA, podem ser usadas na hibridização. De modo geral, a técnica envolve fundir células de mieloma e células linfóides usando um fusogênio tal como polietileno glicol, ou por meios elétricos de conhecimento geral daqueles versados na técnica. Depois da fusão, as células são separadas do meio de fusão e cultivadas em um meio de crescimento seletivo, tal como meio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), para eliminar células parentais não hibridizadas. Pode ser usado qualquer um dos meios descritos aqui, suplementado com ou sem soro, para cultivar hibridomas que secretam anticorpos monoclonais. Como outra alternativa à técnica de fusão celular, células B imortalizadas EBV podem ser usadas para produzir os anticorpos anti-NGF monoclonais da presente invenção. Os hibridomas são expandidos e subclonados, caso desejado, e os sobrenadantes são testados para atividade antiimunogênio por procedimentos de imunoensaio convencionais (por exemplo, radioimunoensaio, imunoensaio enzimático, ou imunoensaio de fluorescência).

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

Hibridomas que produzem os anticorpos referidos podem ser

cultivados in vitro ou in vivo usando procedimentos conhecidos. Os anticorpos monoclonais podem ser isolados do meio de cultura ou de fluidos corporais, por procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina tais como precipitação de sulfato de amônio, eletroforese de gel, diálise, cromatografia, e ultrafiltração, caso desejado. Atividade indesejada, caso presente, pode ser removida, por exemplo, passando a preparação sobre adsorventes feitos do imunogênio fixado a uma fase sólida e elutriando ou liberando os anticorpos desejados do imunogênio. A imunização de um animal hospedeiro com um NGF humano, ou um fragmento contendo a seqüência de aminoácidos alvo conjugada a uma proteína que é imunogênica na espécie a ser imunizada, por exemplo, hemocianina de lampreia de *Fissurella*, albumina sérica, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja usando um agente bifuncional ou de derivação, por exemplo éster de maleimidobenzoila sulfossuccinimida (conjugação através de resíduos cisteína), N-hidroxissuccinimida (através de resíduos lisina), glitaradeído, anidrido succínico, SOCl2, ou R1N=C=NR, onde R e R1 são grupos alquila diferentes, pode produzir uma população de anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais).

Caso desejado, o anticorpo antagonista anti-NGF (monoclonal ou policlonal) de interesse pode ser seqüenciado e a seqüência de polinucleotídeo pode ser então clonada em um vetor para expressão ou propagação. A seqüência codificando o anticorpo de interesse pode ser mantida no vetor em uma célula hospedeira e a célula hospedeira pode ser então expandida e congelada para uso futuro. Em uma alternativa, a seqüência de polinucleotídeo pode ser usada para manipulação genética para "humanizar" o anticorpo ou para melhorar a afinidade, ou outras características do anticorpo. Por exemplo, a região constante pode ser produzida por engenharia para se assemelhar a regiões constantes humanas para evitar reação imune se o anticorpo for usado em ensaios clínicas e tratamentos em seres humanos. Pode ser desejável manipular geneticamente a seqüência de anticorpo para obter maior afinidade para NGF e maior eficácia para inibir NGF. Será evidente para uma pessoa versada na técnica que pode ser feita uma ou

mais alterações de polinucleotídeos para o anticorpo antagonista anti-NGF e ainda manter sua capacidade de ligação a NGF.

Há quatro etapas gerais para humanizar um anticorpo monoclonal. Estas são: (1) determinar o nucleotídeo e seqüência de aminoácidos prevista dos domínios variáveis de cadeia leve e pesada do anticorpo de partida (2) desenhar o anticorpo humanizado, isto é, decidir qual região de estrutura de anticorpo usar durante o processo de humanização (3) as metodologias / técnicas de humanização atuais e (4) a transfecção e expressão do anticorpo humanizado. Veja, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; e 6.180.370.

Foram descritas uma série de moléculas de anticorpos "humanizados" compreendendo um sítio de ligação antigênica derivado de uma imunoglobulina não humana, inclusive anticorpos quiméricos tendo regiões V de roedores ou de roedores modificados e suas regiões determinantes de complementaridade associadas (CDRs) fundidas a domínios constantes humanos. Veja, por exemplo, Winter et al. Nature 349:293-299 (1991), Lobuglio et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. J Immunol. 138:4534-4538 (1987), e Brown et al. Cancer Res. 47:3577-3583 (1987). Outras referências descrevem CDRs de roedores enxertadas em uma região de estrutura de suporte humano (FR) antes de fusão com um domínio constante de anticorpo humano apropriado. Veja, por exemplo, Riechmann et al. Nature 332:323-327 (1988), Verhoeyen et al. Science 239:1534-1536 (1988), e Jones et al. Nature 321:522-525 (1986). Outra referência descreve CDRs de roedores suportadas por regiões de estrutura de roedores recobertas de modo recombinante. Veja, por exemplo, a Publicação de Patente Européia No. 0519596. Estas moléculas "humanizadas" são projetadas para minimizar reação imunológica indesejada contra moléculas de anticorpos anti-humanos de roedores a qual limita a duração e a eficácia de aplicações terapêuticas destas porções em receptores humanos. Por exemplo, a região constante do anticorpo pode ser produzida de tal modo que seja imunologicamente inerte (por exemplo, não inicia um processo de lise de complemento). Veja, por

exemplo, a Publicação de Patente Internacional No. PCT/GB99/01441; o Pedido de Patente do Reino Unido No. 9809951.8. Outros métodos de humanização de anticorpos que também podem ser utilizados são descritos por Daugherty et al., Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 (1991) e nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; e 6.350.861; e na Publicação de Patente Internacional No. WO 01/27160.

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

Em uma alternativa, anticorpos podem ser preprados de modo recombinante e expressados usando qualquer método conhecidos na técnica. Em outra alternativa, os anticorpos podem ser preparados de modo recombinante por tecnologia de "display" de fago. Veja, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; e 6.265.150; e Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994). Alternativamente, a tecnologia de "display" de fago (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990)) pode ser usada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos *in vitro*, a partir de repertórios de gene de domínio variável (V) de imunoglobulina de doadores não-imunizados. De acordo com esta técnica, os genes do domínio V de anticorpos são clonados *in-frame* ou em um gene de proteína de revestimento maior ou menor de um bacteriófago filamentoso, tal como M13 ou fd, e apresentados como fragmentos de anticorpos funcionais sobre a superfície da partícula de fago. Como as partícula filamentosa contém uma cópia de DNA de filamento único do genoma do fago, seleções à base das propriedades funcionais do anticorpo tamgbém

resultam na seleção do gene codificando o anticorpo apresentando estas propriedades. Portanto, o fago simula algumas das propriedades da célula B. O "display" de fago pode ser realizado em uma variedade de formatos; para revisão veja, por exemplo, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Várias fontes de segmentos de V-gene podem ser usados para "display" de fago. Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) isolou uma série diversa de anticorpos antioxazolona de uma biblioteca combinatorial aleatória pequena de genes V derivados dos baços de camundongos imunizados. Um repertório de genes V de doadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos para uma série diversa de antígenos (inclusive auto-antígenos) podem ser isolados essencialmente seguindo as técnicas descritas por Mark *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), ou Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Em uma reação imune natural, genes de anticorpos acumulam mutações em um alto índice (hipermutação somática). Algumas das alterações introduzidas conferirão maior afinidade, e células B apresentando imunoglobulina superficial de alta afinidade são preferencialmente duplicadas e diferenciadas durante subseqüente ataque antigênico. Este processo natural pode ser simulado empregando a técnica conhecida como "permutação de cadeia (*chain shuffling*)." Marks, *et al.*, *Bio/Technol.* 10:779-783 (1992)). Neste método, a afinidade de anticorpos humanos "primários" obtidos por "display" de fago pode ser aprimorada substituindo seqüencialmente os genes de região V de cadeia pesada e leve com repertórios de variantes que ocorrem naturalmente (repertórios) de genes de domínio V obtidos de doadores não imunizados. Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpos com afinidades na faixa pM-nM. Uma estratégia para preparar repertórios de anticorpos de fagos muito grandes (também conhecidos como "*the mother-of-all libraries*") foi descrita por Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266 (1993). Também pode ser usada permutação genética para derivar anticorpos humanos de anticorpos de roedores, onde o anticorpo humano tem afinidades similares e especificidades para o anticorpo de roedor de partida. De acordo com este método, o qual também é referido como "impressão de

epitopo", o gene do domínio V de cadeia pesada ou leve de anticorpos de roedores obtidos por técnica de "display" de fago é substituído com um repertório de genes de domínio V humano, criando quimeras roedor-humanas. A seleção sobre antígeno resulta no isolamento de regiões variáveis humanas capazes de restaurar um sítio de ligação antigênica funcional, isto é, o epitopo governa (imprime) a escolha do parceiro. Quando o processo é repetido de modo a substituir o domínio V de roedor remanescente, um anticorpo humano é obtido (veja a Publicação de Patente Internacional No. WO 93/06213, publicada em 1o. de abrila de 1993). Diferentemente de humanização tradicional de anticorpos de roedores por enxertagem de CDR, esta técnica proporciona anticorpos completamente humanos, os quais não têm estrutura ou resíduos CDR de origem de roedor.

É evidente que embora a discussão acima diz respeito a anticorpos humanizados, os princípios gerais discutidos são aplicáveis para customizar anticorpos para uso, por exemplo, em cães, gatos, primata, eqüinos e bovinos. Adicionalmente é evidente que um ou mais aspectos de humanização de um anticorpo descrito aqui, podem ser combinados, por exemplo, enxertagem de CDR, mutação de estrutura e mutação de CDR.

Anticorpos podem ser preparados de modo recombinante primeiro isolando os anticorpos e células produtoras de anticorpos de animais hospedeiros, obtendo a seqüência genética, e usando a seqüência genética para expressar o anticorpo de modo recombinante em células hospedeiras (por exemplo, células CHO). Outro método o qual pode ser empregado é expressar a seqüência de anticorpos em plantas (por exemplo, tabaco) ou leite transgênico. Foram descritos métodos para expressar anticorpos de modo recombinante em plantas ou leite. Veja, por exemplo, Peeters, et al. Vaccine 19:2756 (2001); Lonberg, N. and D. Huszar Int.Rev.Immunol 13:65 (1995); e Pollock, et al., J Immunol Methods 231:147(1999). Métodos para preparar derivados de anticorpos, por exemplo, humanizados, de cadeia única, e etc. são conhecidos na técnica.

Técnicas de imunoensaios e de classificação por citometria de fluxo tais como classificação celular ativada por fluorescência (FACS) tam-

bém podem ser empregadas para isolar anticorpos que são específicos para NGF.

Os anticorpos podem ser ligados por muitos veículos diferentes. Os veículos podem ser ativos e/ou inertes. Exemplos de veículos de conhecimento geral incluem polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, náilon, amilases, vidro, celuloses naturais e modificadas, poliacrilamidas, agaroses e magnetita. A natureza do veículo pode ser ou solúvel ou insolúvel para os fins da invenção. Os versados na técnica conhecerão outros veículos adequados para ligação de anticorpos, ou serão capazes de determinar os mesmos, usando experimentação de rotina. Em algumas modalidades, o veículo compreende uma porção que tem por alvo o miocárdio.

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

Anticorpos antagonistas anti-NGF podem ser caracterizados usando métodos de conhecimento geral na técnica. Por exemplo, um método é identificar o epitopo ao qual ele liga, ou "mapeamento de epitopo." Há muitos métodos conhecidos na técnica para mapeamento e caracterização da localização de epitopos sobre proteínas, inclusive solvendo a estrutura cristalina de um complexo antígeno-anticorpo, ensaios de competição, ensaios de expressão de fragmento genético, e ensaios à base de peptídeos sintéticos, conforme descrito, por exemplo, no Chapter 11 de Harlow and Lane, Usando Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. Em um exemplo adicional, o mapeamento de epitopos pode ser usado para determinar a seqüência à qual liga um anticorpo antagonista anti-NGF. O mapeamento de epitopos está disponível comercialmente a partir de várias fontes, por exemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Baixos). O epitopo pode ser um epitopo linear, isto é, contido em um único trecho de aminoácidos, ou um epitopo conformacional formado por uma interação tridimensional de aminoácidos que podem não estar necessariamente contidos em um único trecho. Peptídeos de extensões variáveies (por exemplo, no mínimo 4 a 6 aminoácidos de extensão) podem ser isolados ou sintetizados (por exemplo, de modo recombinante) e usados paro ensaios de ligação com um anticorpo antagonista anti-NGF. Em outro exemplo, o epitopo ao qual o anticorpo antagonista anti-NGF liga pode ser determinado em uma triagem sistemática usando sobreposição de peptídeos derivados da seqüência de NGF e determinação da ligação pelo anticorpo antagonista anti-NGF. De acordo com os ensaios de expressão de fragmento genético, a estrutura de leitura aberta codificando NGF é fragmentado ou aleatoriamente ou por construções genéticas específicas e a reatividade dos fragmentos de NGF expressados com o anticorpo a ser testado é determinada. Os fragmentos de gene podem ser produzidos, por exemplo, por PCR e em seguida transcrito e traduzido em proteína in vitro, na presença de aminoácidos radioativos. A ligação do anticorpo aos fragmentos de NGF rotulados radioativamente é então determinada por imunoprecipitação e eletroforese de gel. Alguns epitopos

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

Ainda outro método o qual pode ser usado para caracterizar um anticorpo antagonista anti-NGF é usar ensaios de competição com outros anticorpos que se sabe que ligam ao mesmo antígeno, isto é, vários fragmentos sobre NGF, para determinar se o anticorpo antagonista anti-NGF liga oa mesmo epitopo que outros anticorpos. Ensaios de competição são de conhecimento geral daqueles versados na técnica. Exemplo de anticorpos que podem ser usados nos ensaios de competição para a presente invenção incluem MAb 911, 912, 938, conforme descrito em Hongo, et al., Hybridoma 19:215-227 (2000).

Um vetor de expressão pode ser usado para expressão direta de um anticorpo antagonista anti-NGF. Uma pessoa versada na técnica está familiarizada com administração de vetores de expressão para obter expressão de uma proteína exógena in vivo. Veja, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 6.436.908; 6.413.942; e 6.376.471. A administração de vetores de expressão inclui administração local ou sistêmica, inclusive injeção, administração oral, pistola de partículas ou administração cateterizada, e administração tópica. Em outra modalidade, o vetor de expressão é admi-

nistrado diretamente ao gânglio ou tronco simpático, ou em uma artéria coronária, átrio, ventrículo, ou pericárdo.

Também pode ser usada a liberação orientada de composições terapêuticas contendo um vetor de expressão, ou polinucleotídeos subgênomicos. Técnicas de liberação de DNA mediada por receptores são descritas, por exemplo, em Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Composições terapêuticas contendo um polinucleotídeo são administradas dentro de um alcance de cerca de 100 ng até cerca de 200 mg de DNA para administração local em um protocolo de terapia genética. Faixas de concentração de cerca de 500 ng até cerca de 50 mg, cerca de 1 μg até cerca de 2 mg, cerca de 5 μg até cerca de 500 μg, e cerca de 20 μg até cerca de 100 μg de DNA também podem ser usadas durante um protocolo de terapia genética. Os polinucleotídeos e polipeptídeos terapêuticos podem ser liberados usando veículos de liberação genética. O veículo de liberação genética pode ser de origem viral ou não viral (veja, de modo geral, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; e Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148). A expressão de semelhantes seqüências codificantes pode ser induzida usando promotores heterólogos ou de mamíferos endógenos. A expressão da seqüência codificante pode ser ou constitutiva ou regulada.

Vetores à base de vírus para liberação de um polinucleotídeo desejado e expressão em uma célula desejada são de conhecimento geral na técnica. Veículos à base de vírus típicos incluem, mas não estão limitados a, retrovírus recombinantes (veja, por exemplo, as Publicações de Patentes Internacionais Nos. WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; as Patentes dos Etados Unidos Nos. 5. 219.740 e 4.777.127; a Patente da Grã Bretanha No. 2,200,651; e a Patente Européia No. 0 345 242), vetores à base de alfavírus

(por exemplo, vetores de Sindbis vírus, Semliki forest vírus (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), Ross River vírus (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) e vírus da encefalite eqüina da Venezuela (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), e vetores de vírus adeno-associados (AAV) (veja, por exemplo, as Publicações de Patentes Internacionais Nos. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 e WO 95/00655). Também pode ser empregada a administração de DNA ligado a adenovírus mortos conforme descrito em Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.

Também podem ser empregados veículos e métodos de liberação não virais, inclusive, mas não limitados a, DNA condensado policatiônico ligado ou não ligado a adenovírus morto sozinho (veja, por exemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); DNA ligado a ligante (veja, por exemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); células veículos de liberação de células eucarióticas (veja, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos No. 5.814.482; as Publicações de Patentes Internacionais Nos. WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; e WO 97/42338) e neutralização de carga nucléica ou fusão com membranas celulares. Também pode ser empregado DNA nu. Métodos de introdução de DNA nu típicos são descritos na Publicação de Patente Internacional No. WO 90/11092 e na Patente dos Estados Unidos No. 5,580,859. Lipossomas que podem agir como veículos de liberação genética são descritos na Patente dos Estados Unidos No. 5,422,120; nas Publicações de Patentes Internacionais Nos. WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; e na Patente Européia No. EP 0524968. Abordagens adicionais são descritas em Philip, *Mol. Cell Biol.* (1994) 14:2411, e em Woffendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91:1581.

Outros antagonistas de NGF

Antagonistas de NGF diferentes de anticorpos anti-NGF podem ser usados (relativos a dor da artrite reumatóide e a dor de osteoartrite). Em algumas modalidades da invenção, o antagonista de NGF compreende no mínimo uma molécula anti-sentido capaz de bloquear ou reduzir a expressão de um NGF funcional. Seqüências de nucleotídeos do NGF são conhecidas e estão prontamente disponíveis a partir de bancos de dados disponíveis

publicamente. Veja, por exemplo, Borsani *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 1990, 18, 4020; Accession Number NM 002506; Ullrich *et al.*, *Nature* 303:821-825 (1983). É rotina preparar moléculas de oligonucleotídeos anti-sentidos que especificamente ligarão mRNA de NGF sem ter reação cruzada com outros polinucleotídeos. Sítios típicos de alvo incluem, mas não estão limitados a, o códon de iniciação, as regiões regulatórias 5', a seqüência codificante e a região não traduzida 3'. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos têm cerca de 10 a 100 nucleotídeos de extensão, cerca de 15 a 50 nucleotídeos de extensão, cerca de 18 a 25 nucleotídeos de extensão, ou mais. Os oligonucleotídeos podem compreender modificações da espinha principal tais como, por exemplo, ligações fosforotioato, e modificações de 2'-O açúcar de conhecimento geral na técnica. Moléculas anti-sentido típicas incluem as moléculas anti-sentido de NGF descritas na Publicação dos Estados Unidos No. 20010046959; veja também http://www.rna-tec.com/repair.htm.

Em outras modalidades, o antagonista de NGF compreende no mínimo uma molécula anti-sentido capaz de bloquear ou reduzir a expressão de um receptor de NGF funcional (tal como TrkA e/ou p75). Woolf et al., J. Neurosci. (2001) 21(3):1047-55; Taglialetela et al, J Neurochem (1996) 66(5): 1826-35. Seqüências de nucleotídeos de TrkA e p75 são conhecidas e estão prontamente disponíveis em bancos de dados publicamente disponíves.

Alternativamente, a expressão e/ou liberação de NGF e/ou a expressão de receptores de NGF pode ser reduzida usando *knockdown* genético, morfolino oligonucleotídeos, RNAi, ou ribozimas, métodos que são de conhecimento geral na técnica. Veja http://www.macalester.edu/~montgomery/RNAi.html; http://pub32.ezboard.com/fmorpholinosfrm19.showMessage?topicID=6.topic; http://www.highveld.com/ribozyme.html.

Em outras modalidades, o antagonista de NGF compreende no mínimo um composto inibidor de NGF. Conforme usado aqui, o "composto inibidor de NGF" se refere a um composto diferente de um anticorpo anti-NGF que diretamente ou indiretamente reduz, inibe, neutraliza, ou abole a

atividade biológica do NGF. Um composto inibidor de NGF deve apresentar qualquer uma ou mais das seguintes características: (a) ligação a NGF e inibição da atividade biológica de NGF e/ou de caminhos a jusante mediados por função de sinalização de NGF; (b) prevenção, melhora, ou tratamento de qualquer aspecto de dor (tal como dor de osteoartrite); (c) bloqueio ou redução da ativação de receptores de NGF (inclusive dimerização e/ou autofosforilação de TrkA receptor); (d) aumento da depuração de NGF; (e) inibição (redução) da síntese, produção ou liberação de NGF. Compostos inibidores de NGF típicos incluem os inibidores de NGF de molécula pequena descritos na Publicação dos Estados Unidos No. 20010046959; os compostos que inibem ligação de NGF a p75, conforme descrito na Publicação de Patente Internacional No. WO 00/69829, e PD90780 [ácido 7-(benzolilamino)-4,9-diidro-4-metila-9-oxo-pirazolo[5,1-b]quinazolina-2-carboxílico] conforme descrito por Colquhoun et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310(2):505-11 (2004); os compostos que inibem a ligação de NGF a TrkA e/ou p75, conforme descrito na Publicação de Patente Internacional No. WO 98/17278. Exemplos adicionais de compostos inibidores de NGF incluem os compostos descritos nas Publicações de Patente Internacional Nos. WO 02/17914 e WO 02/20479, e nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.342.942; 6.127.401; e 6.359.130. Compostos inibidores de NGF típicos adicionais são compostos que são inibidores competitivos de NGF. Veja a Patente dos Estados Unidos No. 6.291.247. Além disso, uma pessoa versada na técnica pode preparar outros compostos inibidores de NGF de moléculas pequenas.

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

Em modalidades compreendendo moléculas pequenas, uma molécula pequena pode ter um peso molecular de cerca de qualquer um de 100 a 20.000 daltons, 500 a 15.000 daltons, ou 1000 a 10.000 daltons. Bibliotecas de moléculas pequenas estão disponíveis comercialmente. As moléculas pequenas podem ser administradas usando quaisquer meios conhecidos na técnica, inclusive inalação, por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via intramuscular, por via subcutânea, por via intratecal, por via intraventricular, por via oral, por via enteral, por via parenteral, por via intranasal, ou por via dérmica. Em geral, quando o antagonista de NGF de acordo com a invenção é uma molécula pequena, será administrado no índice de 0,1 a 300 mg/kg do peso do paciente dividido em uma a três ou mais doses. Para um paciente adulto de peso normal, podem ser administradas doses variando de 1 mg a 5 g por dose.

Em outras modalidades, o antagonista de NGF compreende no mínimo um análogo estrutural de NGF. "Análogos estruturais de NGF" na presente invenção se referem a compostos que têm uma estrutura tridimensional similar como parte daquela do NGF e os quais ligam a um receptor de NGF sob condições fisiológicas in vitro ou in vivo, em que a ligação no mínimo parcialmente inibe uma atividade biológica do NGF. Em uma modalidade, o análogo estrutural de NGF liga a um TrkA e/ou um p75 receptor. Análogos estruturais de NGF típicos incluem, mas não estão limitados a, os peptídeos bicíclicos descritos na Publicação de Patente Internacional No. WO 97/15593; os peptídeos bicíclicos descritos na Patente dos Estados Unidos No. 6,291,247; os compostos cíclicos descritos na Patente dos Estados Unidos No. 6,017,878; e peptídeos derivados de NGF descritos na Publicação de Patente Internacional No. WO 89/09225. Análogos estruturais de NGF adequados também podem ser desenhados e sintetizados através de modelagem molecular de ligação de receptor de NGF, por exemplo, pelo método descrito na Publicação de Patente Internacional No. WO 98/06048. Os análogos estruturais de NGF podem ser monômeros ou dímeros / oligômeros em qualquer combinação desejada das mesmas estruturas ou de estruturas diferentes para obter efeitos biológicos e afinidades aprimorados.

Em outras modalidades, a invenção proporciona um antagonista de NGF compreendendo no mínimo um mutante dominante-negativo do TrkA receptor e/ou p75 receptor. Uma pessoa versada na técnica pode preparar mutantes dominantes-negativos de, por exemplo, o TrkA receptor de tal modo que o receptor ligará o NGF e, deste modo, agirá como um "sorvedouro" para capturar NGFs. Os mutantes dominantes-negativos, no entanto, não terão a bioatividade normal do TrkA receptor na ligação a NGF. Mutantes dominantes-negativos típicos incluem, mas não estão limitados a, os mutantes descritos nas seguintes referências: Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 10884; Eide et al., J. Neurosci. 1996, 16, 3123; Liu et al., J. Neurosci 1997, 17, 8749; Klein et al., Cell 1990, 61, 647; Valenzuela et al., Neuron 1993, 10, 963; Tsoulfas et al., Neuron 1993, 10, 975; e Lamballe et al., EMBO J. 1993, 12, 3083, cada uma das quais é incorporada aqui, a este pedido de patente, por meio de referência em sua totalidade. Os mutantes dominantes-negativos podem ser administrados em forma de proteína ou sob a forma de um vetor de expressão de tal modo que o mutante dominante negativo, por exemplo, TrkA receptor mutante, é expressado in vivo. A proteína ou vetor de expressão pode ser administrado usando quaisquer meios conhecidos na técnica, tais como por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via intramuscular, por via subcutânea, por via intratecal, por via intraventricular, por via oral, por via enteral, por via parenteral, por via intranasal, por via dérmica, ou por inalação. Por exemplo, a administração de vetores de expressão inclui administração local ou sistêmica, inclusive injeção, administração oral, pistola de partículas ou administração cateterizada, e administração tópica. Uma pessoa versada na técnica está familiarizada com a administração de vetores de expressão para obter a expressão de uma proteína exógena in vivo. Veja, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 6.436.908; 6.413.942; e 6.376.471.

Também pode ser usada a liberação orientada de composições terapêuticas contendo um polinucleotídeo anti-sentido, vetor de expressão, ou polinucleotídeos subgenômicos. Técnicas de liberação de DNA mediada por receptores são descritas, por exemplo, em Findeis et al., Trends Biote-

chnol. (1993) 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Composições terapêuticas contendo um polinucleotídeo são administradas dentro de um alcance de cerca de 100 ng até cerca de 200 mg de DNA para administração local em um protocolo de terapia genética. Em algumas modalidades, também podem ser usadas faixas de concentração de cerca de 500 ng até cerca de 50 mg, cerca de 1 µg até cerca de 2 mg, cerca de 5 µg até cerca de 500 µg, e cerca de 20 µg até cerca de 100 µg de DNA ou mais durante um protocolo de terapia genética. Os polinucleotídeos e polipeptídeos terapêuticos da presente invenção podem ser liberados usando veículos de liberação genética. O veículo de liberação genética pode ser de origem viral ou não viral (veja de modo geral, Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1994) 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy* (1994) 5:845; Connelly, *Human Gene Therapy* (1995) 1:185; e Kaplitt, *Nature Genetics* (1994) 6:148). A expressão de semelhantes seqüências codificantes pode ser induzida usando promotores e/ou intensificadores endógenos mamíferos ou heterólogos. A expressão da seqüência codificante pode ser ou constitutiva ou regulada.

Vetores à base de vírus para liberação de um polinucleotídeo desejado e expressão em uma célula desejada são de conhecimento geral na técnica. Veículos à base de vírus típicos incluem, mas não estão limitados a, retrovírus recombinantes (veja, por exemplo, as Publicações de Patente Internacional Nos. WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5. 219.740 e 4.777.127; a Patente da Grã Bretanha No. 2.200.651; e a Patente Européia No. 0 345 242), vetore à base de alfavírus (por exemplo, vetores de Sindbis vírus, Semliki forest vírus (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), Ross River vírus (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) e vírus da encefalite eqüina da Venezuela (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), e vírus adeno-associado (AAV) vectors (veja, por

exemplo, as Publicações de Patente Internacional Nos. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 e WO 95/00655). Também pode ser empregada a administração de DNA ligado a adenovírus mortos conforme descrito em Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.

Também podem ser empregados veículos e métodos de liberação não viral, inclusive, mas não limitados a, DNA condensado policatiônico ligado ou não ligado a adenovírus morto somente (veja, por exemplo, Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3:147); DNA ligado a ligante (veja, por exemplo, Wu, *J. Biol. Chem.* (1989) 264:16985); células veículos de liberação de células eucarióticas (veja, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos No. 5.814.482; as Publicações de Patente Internacional Nos. WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; e WO 97/42338) e neutralização de carga nucléica ou fusão com membranas celulares. Também pode ser empregado DNA nu. Métodos de introdução de DNA nu típicos são descritos na Publicação de Patente Internacional No. WO 90/11092 e na Patente dos Estados Unidos No. 5.580.859. Lipossomas que podem agir como veículos de liberação genética são descritos na Patente dos Estados Unidos No. 5.422.120; nas Publicações de Patente Internacional Nos. WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; e na Patente Européia No. 0524968. Abordagens adicionais são descritas em Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411, e em Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581.

Também é evidente que um vetor de expressão pode ser usado para orientar a expressão de quaisquer dos antagonistas de NGF à base de proteína descritos aqui, (por exemplo, anticorpo anti-NGF, TrkA imunoadesina, e etc.). Por exemplo, outros fragmentos de TrkA receptor que são capazes de bloquear (desde bloqueio parcial a completo) NGF e/ou uma atividade biológica de NGF são conhecidos na técnica.

Em outra modalidade, o antagonista de NGF compreende no mínimo uma TrkA imunoadesina. TrkA imunoadesinas conforme usado aqui, se referem a moléculas quiméricas solúveis compreendendo o domínio extracelular de um TrkA receptor e uma seqüência de imunoglobulina, a qual conserva a especificidade de ligação do TrkA receptor (substancialmente

conserva a especificidade de ligação do trkA receptor) e é capaz de ligar a NGF.

TrkA imunoadesinas são conhecidas na técnica, e foi visto que bloqueiam a ligação de NGF ao TrkA receptor. Veja, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos No. 6.153.189. Brennan et al. relatam a administração de TrkA imunoadesina em um modelo de dor pós-cirúrgica em rato. Veja Society for Neuroscience Abstracts 24 (1-2) 880 (1998). Em uma modalidade, a TrkA imunoadesina compreende uma fusão de uma seqüência de aminoácidos de TrkA receptor (ou uma porção da mesma) de domínio extracelular de TrkA capaz de ligar NGF (em algumas modalidades, uma seqüência de aminoácidos que substancialmente conserva a especificidade de ligação do trkA receptor) e uma seqüência de imunoglobulina. Em algumas modalidades, o TrkA receptor é uma seqüência de TrkA receptor humano, e a fusão é com uma seqüência de domínio constante de imunoglobulina. Em outras modalidades, a seqüência de domínio constante de imunoglobulina é uma seqüência de domínio constante de imunoglobulina de cadeia pesada. Em outras modalidades, a associação de duas fusões de cadeia pesada de imunoglobulina-TrkA receptor (por exemplo, através de ligação covalente por uma ou mais ligações dissulfeto) resulta em uma estrutura semelhante a imunoglobulina homodimérica. Uma cadeia leve de imunoglobulina pode ser adicionalmente associada a uma ou ambas as quimeras TrkA receptor-imunoglobulina no dímero ligado a dissulfeto para produzir uma estrutura homotrimérica ou homotetramérica. Exemplos de TrkA imunoadesinas adequadas incluem as descritas na Patente dos Estados Unidos No. 6.153.189.

Em outra modalidade, o antagonista de NGF compreende no mínimo um anticorpo anti-TrkA capaz de bloquear, suprimir, alterar, e/ou reduzir a interação física de NGF com o TrkA receptor e/ou sinalização a jusante, por meio da qual uma atividade biológica de NGF é reduzida e/ou bloqueada. Anticorpos anti-TrkA são conhecidos na técnica. Anticorpos anti-TrkA típicos incluem os descritos nas Publicações de Patente Internacional Nos. WO 97/21732, WO 00/73344, WO 02/15924, e a Publicação de Patente dos Estados Unidos No. 2001/0046959.

Em outra modalidade, o antagonista de NGF compreende no mínimo um anticorpo anti-p75 capaz de bloquear, suprimir e/ou reduzir a interação física de NGF com o p75 receptor e/ou sinalização a jusante, por meio da qual uma atividade biológica de NGF é reduzida e/ou bloqueada.

Em outra modalidade, o antagonista de NGF compreende no mínimo um inibidor de quinase capaz de inibir sinalização de quinase a jusante associada a atividade de TrkA e/ou p75 receptor. Um inibir de quinase típico é K252a uo K252b, o qual é conhecido na técnica e descrito em Knusel et al., J. Neurochem. 59:715-722 (1992); Knusel et al., J. Neurochemistry 57:955-962 (1991); Koizumi et al., J. Neuroscience 8:715-721 (1988); Hirata et al., Chemical Abstracts 111:728, XP00204135, veja sumário e 12th Collective Chemical Substance Index, p. 34237, c. 3 (5-7), 55-60, 66-69), p. 34238, c.1 (41-44), c.2 (25-27, 32-33), p. 3423, c.3 (48-50, 52-53); e a Patente dos Estados Unidos No. 6.306.849.

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

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

NGF antagonistas, inclusive anticorpos antagonistas anti-NGF, podem ser identificados ou caracterizados usando métodos conhecidos na técnica, por meio dos quais é detectada e/ou medida a redução, melhora, ou neutralização da uma biológica atividade de NGF. Podem ser usados métodos descritos na publicação de patente internacional No. PCT WO 04/065560. Outro método, por exemplo, um ensaio de ativação de receptor de quinase (KIRA) descrita nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.766.863 e 5.891.650, pode ser usado para identificar agentes anti-NGF. Este ensaio tipo ELISA é adequado para medição qualitativa ou quantitativa da ativação de quinase medindo a autofosforilação do domínio quinase de uma proteína tirosina quinase receptora (nas partes que se seguem "rPTK"), por exemplo, TrkA receptor, bem como para identificação e caracterização de antagonistas potenciais de um rPTK selecionado, por exemplo, TrkA. O primeiro estágio do ensaio envolve fosforilação do domíno quinase de um

receptor de quinase, por exemplo, um TrkA receptor, em que o receptor está presente na membrana celular de uma célula eucariótica. O receptor pode ser um receptor endógeno ou ácido nucléico codificando o receptor, ou um constructo receptor, pode ser transformado dentro da célula. Tipicamente, uma primeira fase sólida (por exemplo, uma cavidade de uma primeira lâmina de ensaio) é revestida com uma população substancialmente homogênea de semelhantes células (geralmente uma linhagem celular de mamífero) de modo que as células aderem à fase sólida. Freqüentemente, as células são aderentes e deste modo aderem naturalmente à primeira fase sólida. Se for usado um "constructo receptor", geralmente compreende uma fusão de um receptor de quinase e um polipeptídeo de etiqueta. O polipeptídeo de etiqueta é reconhecido pelo agente de captura, freqüentemente um anticorpo de captura, na parte ELISA do ensaio. Um analisado, tal como um antagonista de NGF candidato (inclusive anticorpo antagonista anti-NGF) é em seguida adicionado junto com NGF às cavidades tendo as células aderentes, de tal modo que o receptor de tirosina quinase (por exemplo, TrkA receptor) é exposto a (ou posto em contato com) NGF e o analito. Este ensaio possibilita identificação de antagonistas (inclusive anticorpos) que inibem a ativação de TrkA por seu NGF ligante. Depois de exposição a NGF e o analisado, as células aderentes são solubilizadas usando um tampão de lise (o qual tem um detergente solubilizante no mesmo) e suave agitação, deste modo liberando lisado celular o qual pode ser submetido à parte ELISA do ensaio diretamente, sem a necessidade de concentração ou clarificação do lisado celular.

O lisado celular preparado deste modo em seguida está pronto a ser submetido ao estágio ELISA do ensaio. Como uma primeira etapa no estágio ELISA, uma segunda fase sólida (geralmente uma cavidade de uma lâmina de microtítulo ELISA) é revestida com um agente de captura (freqüentemente um anticorpo de captura) o qual liga especificamente ao receptor de tirosina quinase, ou, no caso de um constructo receptor, ao polipeptídeo finalizador. O revestimento da segunda fase sólida é realizado de modo que o agente de captura adere à segunda fase sólida. O agente de captura é

de modo geral um anticorpo monoclonal, mas, conforme é descrito nos exemplos aqui, também podem ser usados anticorpos policlonais. O lisado celular obtido é em seguida exposto a, ou contactado com, o agente de captura aderente de modo que o receptor ou constructo receptor adere a (ou é capturado em) a segunda fase sólida. Em seguida é realizada uma etapa de lavagem, de modo a remover o lisado celular não ligado, deixando o receptor ou constructo receptor capturado. O receptor ou constructo receptor aderente ou capturado é em seguida exposto a, ou contactado com, um anticorpo antifosfotirosina o qual identifica resíduos tirosina fosforilados no receptor de tirosina quinase. Em uma modalidade, o anticorpo antifosfotirosina é conjugado (diretamente ou indiretamente) a uma enzima a qual catalisa uma alteração de cor de um reagente colorido não-radioativo. Por conseguinte, a fosforilação do receptor pode ser medida por uma alteração de cor subseqüente do reagente. A enzima pode ser ligada ao anticorpo antifosfotirosina diretamente, ou uma molécula de conjugação (por exemplo, biotina) pode ser conjugada ao anticorpo antifosfotirosina e a enzima pode ser em seguida ligada ao anticorpo antifosfotirosina através da molécula de conjugação. Finalmente, a ligação do anticorpo antifosfotirosina ao receptor ou constructo receptor capturado é medida, por exemplo, por uma alteração de cor no reagente colorido.

Antagonistas de NGF (tais como anticorpo antagonista anti-NGF) também podem ser identificados incubando um agente candidato com NGF e monitorando qualquer uma ou mais das seguintes características: (a) ligação a NGF e inibição da atividade biológica de NGF ou caminhos a jusante mediados por função de sinalização de NGF; (b) inibição, bloqueio ou redução da ativação de receptores de NGF (inclusive dimerização e/ou autofosforilação de TrkA); (c) aumento da depuração de NGF; (d) tratamento ou prevenção de qualquer aspecto de dor da artrite reumatóide ou dor de osteoartrite; (e) inibição (redução) da síntese, produção ou liberação de NGF. Em algumas modalidades, um antagonista de NGF (por exemplo, um anticorpo antagonista anti-NGF) é identificado incubando um agente candidato com NGF e monitorando a ligação e/ou resultante redução ou neutralização

de uma atividade biológica de NGF. O ensaio de ligação pode ser realizada com um ou mais polipeptídeos de NGF purificados, ou com células expressando naturalmente, ou transfectadas para expressar, um ou mais polipeptídeos de NGF. Em uma modalidade, o ensaio de ligação é um ensaio de ligação competitiva, onde a capacidade de um agente candidato (tal como um anticorpo) para competir com um anticorpo antagonista anti-NGF conhecido para ligação de NGF é avaliada. O ensaio pode ser realizado em vários formatos, inclusive o formato ELISA. Em outras modalidades, um antagonista de NGF (tais como anticorpo antagonista anti-NGF) é identificado incubando um agente candidato com NGF e monitorando a ligação e inibição resultante de dimerização e/ou autofosforilação de trkA receptor.

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

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

Composições para uso nos métodos da invenção

As composições usadas nos métodos da invenção (relativos a dor da artrite reumatóide e dor de osteoartrite) compreendem uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF (tal como um anticorpo anti-NGF), e, em algumas modalidades, adicionalmente compreendem um excipiente farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição é para uso em quaisquer dos métodos descritos aqui. Exemplos de semelhantes composições, bem como formular, também são descritos em uma seção anterior e abaixo. Em uma modalidade, a composição compreende um antagonista de NGF. Em outra modalidade, a composição compreende um ou mais antagonistas de NGF. Em outra modalidade, a composição compreende um ou mais antagonistas de NGF selecionados entre qualquer um ou mais dos seguintes : um antagonista (por exemplo, um anticorpo) que liga (interage fisicamente com) NGF, um antagonista que liga a um receptor de NGF (tal como um TrkA e/ou p75 receptor), e um antagonista que reduz (impede e/ou bloqueia) sinalização de receptor de NGF a jusante. Em ainda outras modalidades, a composição compreende qualquer antagonista de NGF que não é uma TrkA imunoadesina (isto é, é diferente de uma TrkA imunoadesina). Em outras modalidades, a composição compreende qualquer antagonista de NGF que é diferente de um anticorpo anti-NGF. Em ainda outras modalidades, a composição compreende qualquer antagonista de NGF que é diferente de uma TrkA imunoadesina e diferente de um anticorpo anti-NGF. Em outras modalidades, um antagonista de NGF inibe (reduz) a síntese, produção ou liberação de NGF. Em algumas modalidades, o antagonista de NGF liga NGF e não tem reação cruzada significativamente com neurotrofinas relacionadas (tais como NT3, NT4/5, e/ou BDNF). Em algumas modalidades, o

antagonista de NGF não está associado a uma reação imune adversa. Em algumas modalidades, o antagonista de NGF é selecionado entre o grupo consistindo em um anticorpo anti-NGF, uma molécula anti-sentido dirigida para um NGF (inclusive uma molécula anti-sentido dirigida para um ácido nucléico codificando NGF), uma molécula anti-sentido dirigida para um receptor de NGF (tal como TrkA e/ou p75), um composto inibidor de NGF, um análogo estrutural de NGF, uma mutação dominante-negativa de um TrkA receptor que liga um NGF, uma TrkA imunoadhesina, um anticorpo anti-TrkA, um anticorpo anti-p75 e um inibidor de quinase. Em outra modalidade, o antagonista de NGF é um anticorpo anti-NGF. Em outras modalidades, o anticorpo anti-NGF reconhece NGF humano. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-NGF é humano. Em ainda outras modalidades, o anticorpo anti-NGF é humanizado (tal como anticorpo E3 descrito aqui). Em ainda outra modalidade, o anticorpo anti-NGF compreende uma região constante que não inicia um processo de uma reação imune indesejada ou indesejável, tal como lise mediada por anticorpo ou ADCC. Em outras modalidades, o anticorpo anti-NGF compreende uma ou mais CDRs do anticorpo E3 (tais como uma, duas, três, quatro, cinco, ou, em algumas modalidades, todas as seis CDRs de E3).

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

A composição usada na presente invenção pode compreender adicionalmente veículos, excipientes, ou estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 20th Ed.

(2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover.), sob a forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Excipientes farmaceuticamente aceitáveis são adicionalmente descritos aqui.

O antagonista de NGF e composições dos mesmos também podem ser usados em combinação com outros agentes que servem para reforçar e/ou complementar a eficácia dos agentes. Para dor de osteoartrite, antagonista de NGF pode ser administrado em combinação com um ou mais analgésicos diversos, NSAIDS, ou esteróides. Analgésicos incluem, mas não estão limitados a, acetaminofen, tramadol, capsaicina (tópica). Exemplos de NSAIDS são salicilatos acetilados inclusive aspirina; salicilatos não acetilados inclusive salsalato, diflunisal; ácidos acéticos inclusive etodolac, diclofenac, indometacina, cetorolac, nabumetona; ácidos propiônicos inclusive fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, cetoprofen, naproxen, sódio naproxen, oxaprozin; fenamatos inclusive meclofenamato, ácido mefenâmico; fenilbutazona, piroxicam; inibidores de COX-2 inclusive celecoxib, etoricoxib, valdecoxib, rofecoxib, lumiracoxib. Um exemplo de esteróides é corticosteróides intraarticulares (IACs).

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

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

O antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) pode ser administrado a um indivíduo (para artrite reumatóide e osteoartrite) através de qualquer via adequada. Deve ser evidente para a pessoa versada na técnica que não se pretende que os exemplos descritos aqui, sejam limitantes porém ilustrativos das técnicas disponíveis. Por conseguinte, em al-

gumas modalidades, o antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) é administrado a um indivíduo de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa, por exemplo, como um bólus ou por infusão contínua durante um período de tempo, por via intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, por via sublingual, intrassinovial, através de insuflação, intratecal, oral, inalação ou via tópica. A administração pode ser sistêmica, por exemplo, administração intravenosa, ou localizada. Nebulizadores disponíveis comercialmente para formulações líquidas, inclusive nebulizadores de jato e nebulizadores ultrassônicos são úteis para administração. As formulações líquidas podem ser diretamente nebulizadas e pó liofilizado pode ser nebulizado depois de reconstituição. Alternativamente, antagonista de NGF (tais como anticorpo antagonista anti-NGF) podem ser aerosolizados usando uma formulação de fluorocarbono e um inalador de dose dimensionada, ou inalada como um pó liofilizado e triturado.

Em uma modalidade, um antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF) é administrado através de técnicas de liberação local orientada ou sítio-específicas. Exemplos de técnicas de liberação local orientada ou sítio-específicas incluem várias fontes de depósitos implantáveis do antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) ou catéteres de liberação local, tais como catéteres de infusão, um cateter residente, ou um cateter de agulha, enxertos sintéticos, revestimentos adventícios, derivações e fios ou outros dispositivos implantáveis, veículos sítio específicos, injeção direta, ou aplicação direta. Veja, por exemplo, a Publicação de Patente Internacional No. WO 00/53211 e a Patente dos Estados Unidos No. 5.981.568.

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

Excipientes farmaceuticamente aceitáveis são conhecidos na técnica, e são substâncias relativamente inertes que facilitam a administração de uma substância farmacologicamente eficaz. Por exemplo, um excipiente pode dar forma ou consistência, ou agir como um diluente. Excipientes adequados incluem mas não estão limitados a agentes estabilizantes, agentes umectantes e emulsificantes, sais para variar a osmolaridade, agentes encapsulantes, tampões, e intensificadores da penetração na pele. Excipientes bem como formulações para liberação de fármacos parenterais e não-parenterais são determinaddos em Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

Em algumas modalidades, estes agentes são formulados para administração por injeção (por exemplo, por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via subcutânea, por via intramuscular, e etc.). Por conseguinte, estes agentes podem ser combinados com veículos farmaceuticamente aceitáveis tais como solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose, e semelhantes. O regime de dosagem em particular, isto é, dose, momento e repetição, dependerá do indivíduo em particular e do histórico médico daquele indivíduo.

Um anticorpo anti-NGF pode ser administrado usando qualquer método adequado, inclusive por injeção (por exemplo, por via intraperitoneal, por via intravenosa, por via subcutânea, por via intramuscular, e etc.). Anticorpos anti-NGF também podem ser administrados através de inalação, conforme descrito aqui. De modo geral, para administração de anticorpos anti-NGF, uma dosagem candidata inicial pode ser cerca de 2 mg/kg. Para os fins da presente invenção, uma dosagem diária típica pode variar a partir de cerca de qualquer de 0,1 µg/kg a 1 µg/kg a 3 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Por exemplo, um anticorpo anti-NGF pode ser administrado a cerca de 1 µg/kg, cerca de 10 µg/kg, cerca de 20 µg/kg, cerca de 50 µg/kg, cerca de 100 µg/kg, cerca de 200 µg/kg, cerca de 500 µg/kg, cerca de 1 mg/kg, ou cerca de 2 mg/kg. Para administrações repetidas durante vários dias ou mais tempo, dependendo da condição, o tratamento é sustentado

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

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

Em geral, quando não é um anticorpo, um antagonista de NGF (em algumas modalidades) pode ser administrado no índice de cerca de 0,1 a 300 mg/kg do peso do paciente dividido em uma a três doses, ou conforme descrito aqui. Em algumas modalidades, para um paciente adulto de peso normal, podem ser administradas doses variando a partir de cerca de 0,3 a

5.00 mg/kg. O regime de dosagem em particular, isto é, dose, momento e repetição, dependerão do indivíduo em particular e do histórico médico do indivíduo, bem como as propriedades dos agentes individuais (tais como a meia-vida do agente, e outras considerações de conhecimento geral na técnica).

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

Considerações empíricas, tais como a meia-vida, geralmente contribuirão para a determinação da dosagem. Por exemplo, anticorpos que são compatíveis com o sistema imune humano, tais como anticorpos humanizados ou anticorpos totalmente humanos, podem ser usados para prolongar a meia-vida do anticorpo e para evitar que o anticorpo seja atacado pelo sistema imune do hospedeiro. A freqüência da administração pode ser determinada e ajustada durante o curso da terapia, e geralmente, mas não necessariamente, se baseia no tratamento e/ou na supressão e/ou melhora e/ou retardo da dor. Alternativamente, podem ser apropriadas formulações de liberação contínua sustentada de antagonistas de NGF (por exemplo, anticorpos antagonistas anti-NGF). Várias formulações e dispositivos para obter liberação sustentada são conhecidos na técnica.

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

NGF (por exemplo, anticorpo antagonista anti-NGF), pode ser seguido um indicador de dor.

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

Em algumas modalidades, mais de um antagonista de NGF, tais como um anticorpo antagonista anti-NGF, podem estar presentes. No mínimo um, no mínimo dois, no mínimo três, no mínimo quatro, no mínimo cinco, ou mais antagonistas de NGF diferentes (por exemplo, anticorpos antagonistas anti-NGF) podem estar presentes. Geralmente, os antagonistas de NGF (tais como anticorpos antagonistas anti-NGF) têm atividades complementares que não afetam de modo adverso umas às outras. Antagonistas de NGF também podem ser usados em combinação com outros agentes que servem para reforçar e/ou complementar a eficácia dos agentes.

Formulações terapêuticas do antagonista de NGF (por exemplo, anticorpo antagonista anti-NGF) usadas de acordo com a presente invenção são preparadas para armazenamento misturando um antagonista de NGF (por exemplo, um anticorpo) tendo o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis opcionais (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)), sob a forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não-tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregadas, e podem compreender tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; sais tais como

cloreto de sódio; antioxidantes inclusive ácido ascórbico e metionina; preservantes (tais como cloreto de amônio de octadecildimetilbenzila; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool benzílico ou butílico; alquila parabenos, tais como metila ou propila parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos) ; proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos inclusive glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íons formadores de sais tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não-iônicos tais como TWEENTM, PLURONICSTM ou polietileno glicol (PEG).

Lipossomas contendo o antagonista de NGF (tal como anticorpo antagonista anti-NGF) são preparados por meio de métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); e nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 4.485.045 e 4.544.545. Lipossomas com tempo de circulação reforçado são descritos na Patente dos Estados Unidos No. 5.013.556. Lipossomas particularmente úteis podem ser produzidos pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídeos compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada e PEG (PEG-PE). Lipossomas são extrusados através de filtros de tamanho de poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado.

Os ingredientes ativos também podem ser capturados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de gelatina ou hidroximetilcelulose e microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, em sistemas de liberação de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas) ou

em macroemulsões. As técnicas referidas são descritas em Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

Preparações de liberação sustentada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o antagonista (tal como o anticorpo), cujas matrizes estão sob a forma de artigos modelados, por exemplo, filmes, ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietila-metacrilato), ou 'poli(vinila álcool)), polilactidas (Patente dos Estados Unidos. No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e 7 etila-L-glutamato, acetato de etileno-vinila não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tais como o LUPRON DEPOT TM (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarose, e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

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

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

Para preparar composições sólidas tais como comprimidos, o ingrediente ativo principal é misturado com um veículo farmacêutico, por exemplo, ingredientes para fabricação de tabletes convencionais tais como amido de milho, lactose, sacarose, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio, fosfato dicálcico ou gomas, e outros diluentes farmacêuticos,

por exemplo, água, para formar uma composição de pré-formulação sólida contendo uma mistura homogênea de um composto da presente invenção, ou um sal farmaceuticamente aceitável não-tóxico do mesmo. Ao se referir a estas composições de pré-formulações como homogêneas, se indica que o ingrediente ativo é dispersado uniformemente por toda a composição de modo que a composição pode ser prontamente subdividida em formas de unidade de dosagem igualmente eficazes tais como comprimidos, pílulas e cápsulas. Esta composição de pré-formulação sólida é em seguida subdividida em formas de unidade de dosagem do tipo descrito acima contendo a partir de 0,1 até cerca de 500 mg do ingrediente ativo da presente invenção. Os comprimidos ou pílulas da nova composição podem ser revestidos ou compostos de outro modo para proporcionar uma forma de dosagem proporcionando a vantagem de ação prolongada. Por exemplo, o comprimido ou pílula pode compreender uma dosagem interna e um componente de dosagem externa, o último estando sob a forma de um envoltório sobre o precedente. Os dois componentes podem ser separados por uma camada entérica que serve para resistir a desintegração no estômago e permite que o componente interno passe intacto para dentro do duodeno ou tenha a liberação retardada. Uma variedade de materiais pode ser usada para semelhantes camadas ou revestimentos entéricos, semelhantes materiais inclusive uma série de ácidos poliméricos e misturas de ácidos poliméricos com materiais tais como goma-laca, álcool cetílico e acetato celulósico.

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

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

InfonutrolTM, LipofundinTM e LipiphysanTM. O ingrediente ativo pode ser ou dissolvido em uma composição de emulsão pré-misturada ou alternativamente pode ser dissolvido em um óleo (por exemplo, óleo de soja, óleo de açafrão, óleo de algodão, óleo de gergelim, óleo de milho ou óleo de amêndoas) e uma emulsão formada na mistura com um fosfolipídeo (por exemplo, fosfolipídeos de ovo, fosfolipídeos de soja ou lecitina de soja) e água. Será reconhecido que outros ingredientes podem ser adicionados, por exemplo, glicerol ou glicose, para ajustar a tonicidade da emulsão. Emulsões adequadas tipicamente conterão até 20% de óleo, por exemplo, entre 5 e 20%. A emulsão de gordura pode compreender gotículas de gordura entre 0,1 e 1,0 .1m, particularmente 0,1 e 0,5 .1m, e têm um pH dentro do alcance de 5,5 a 8,0.

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

Composições para inalação ou insuflação incluem soluções e suspensões em solventes aquosos ou orgânicos farmaceuticamente aceitáveis, ou misturas dos mesmos, e pós. As composições líquidas ou sólidas podem conter excipientes farmaceuticamente aceitáveis adequados conforme determinado acima. Em algumas modalidades, as composições são administrados pela via oral ou nasal respiratória para efeito local ou sistêmico. Composições em solventes farmaceuticamente aceitáveis preferencialmente estéreis podem ser nebulizadas por uso de gases. Soluções nebulizadas podem ser aspiradas diretamente do dispositivo de nebulização ou o dispositivo de nebulização pode ser fixado a uma máscara facial, dreno ou máquina de respiração por pressão positiva intermitente. Composições em solução, suspensão ou pó podem ser administradas, preferencialmente por via oral ou por via nasal, a partir de dispositivos os quais liberam a formulação em uma maneira apropriada.

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

KITS COMPREENDENDO ANTICORPOS E POLINUCLEOTÍDEOS DA INVENÇÃO

A invenção também proporciona kits compreendendo anticorpos ou polipeptídeos para uso na detecção e/ou terapia. Por conseguinte, em algumas modalidades, os kits compreendem um anticorpo E3. Em algumas modalidades, o kit compreende qualquer anticorpo ou polipeptídeo descrito aqui.

Em outros aspectos, os kits podem ser usados para quaisquer dos métodos descritos aqui, inclusive, por exemplo, para tratar um indivíduo com dor (inclusive dor pós-cirúrgica, dor da artrite reumatóide, e dor de osteoartrite). Os kits desta invenção estão dentro de embalagem adequada, e opcionalmente podem proporcionar componentes adicionais tais como, tampões e instruções para uso do anticorpo em quaisquer dos métodos descritos aqui. Em algumas modalidades, os kits incluem instruções para tratar dor. Em algumas modalidades, o kit compreende um anticorpo antagonista anti-NGF descrito aqui, e instruções para tratar e/ou prevenir a dor da artrite reumatóide em um indivíduo. Em outras modalidades, o kit compreende um antagonista de NGF (tal como um anticorpo antagonista anti-NGF) descrito aqui, e instruções para tratar e/ou prevenir a dor de osteoartrite em um indivíduo. Em algumas das modalidades, o anticorpo antagonista anti-NGF é anticorpo E3.

Em outro aspecto, a invenção proporciona kits compreendendo um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo E3 conforme descrito aqui. Em algumas modalidades, os kits adicionalmente compreendem instruções para uso do polinucleotídeo em quaisquer dos métodos descritos aqui.

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

Foi desenvolvido um novo método para caracterizar uma CDR de um anticorpo e/ou alterar (tal como melhorando) a afinidade de ligação de um polipeptídeo, tal como um anticorpo, denominado "mutagênese de varredura de bibliotecas". Geralmente, a mutagênese de varredura de bibliotecas funciona como se segue. Uma ou mais posições de aminoácidos na CDR

são substituídas com dois ou mais (tais como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20) aminoácidos usando métodos reconhecidos na técnica. Isto produz pequenas bibliotecas de clones (em algumas modalidades, uma para cada posição de aminoácido que é analisado), cada um com uma complexidade de dois ou mais membros (se dois ou mais aminoácidos são substituídos em cada posição). De modo geral, a biblioteca também inclui um clone compreendendo o aminoácido nativo (não substituído). Um pequeno número de clones, por exemplo, cerca de 20 a 80 clones (dependendo da complexidade da biblioteca), de cada biblioteca são triados para afinidade de ligação ao polipeptídeo alvo, e são identificados candidatos com aumento da ligação, a mesma ligação, ligação reduzida ou nenhuma ligação. Os métodos para determinar a afinidade de ligação são de conhecimento geral na técnica. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é determinada usando análise de ressonância de plasmon superficial BIAcore, a qual detecta diferenças na afinidade de ligação de cerca de 2 vezes ou mais. BIAcore é particularmente útila quando o anticorpo de partida já liga com uma afinidade relativamente alta, por exemplo uma K_D de cerca de 10 nM ou menos. Triagem usando ressonância de plasmon superficial BIAcore é descrita nos Exemplos, aqui.

Em outras modalidades, a afinidade de ligação é determinada usando Kinexa Biocensor, ensaios de proximidade de cintilação, ELISA, imunoensaio ORIGEN (IGEN), extinção de fluorescência, transferência de fluorescência, e/ou "display" de levedura. Em outras modalidades, a afinidade de ligação é triada usando um bioensaio adequado.

Em algumas modalidades, cada posição de aminoácido em uma CDR é substituída (em algumas modalidades, uma de cada vez) com todos os 20 aminoácidos naturais usando métodos de mutagênese reconhecidos na ténica (alguns dos quais são descritos aqui). Isto gera pequenas bibliotecas de clones (em algumas modalidades, uma para cada posição de aminoácido que é analisada), cada uma com uma complexidade de 20 membros (se todos os 20 aminoácidos são substituídos em cada posição).

Em algumas modalidades, a biblioteca a ser triada compreende

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

Em algumas modalidades, a CDR é CDRH3 e/ou CDRL3. Em outras modalidades, a CDR é uma ou mais de CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, e/ou CDRH3. Em algumas modalidades, a CDR é uma CDR de Kabat, uma CDR de Chothia, ou uma CDR estendida.

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

Em algumas modalidades, são conduzidas múltiplas rodadas de triagem. Por exemplo, candidatos (cada um compreendendo uma substituição de aminoácido em uma ou mais posição de uma ou mais CDRs) com aprimorada ligação também são úteis para o desenho de uma segunda biblioteca contendo no mínimo o aminoácido original e substituído em cada posição de CDR aprimorada (isto é, posição de aminoácido na CDR na qual um mutante de substituição apresentou ligação aprimorada). A preparação, e triagem ou seleção desta biblioteca são discutidas adicionalmente abaixo.

Mutagênese de triagem de bibliotecas também proporciona um

meio para caracterizar uma CDR, na medida que a freqüência de clones com ligação aprimorada, a mesma ligação, ligação reduzida ou nenhuma ligação também proporciona informação referente à importância de cada posição de aminoácido para a estabilidade do complexo antígeno-anticorpo. Por exemplo, se uma posição da CDR conserva ligação quando alterada para todos os 20 aminoácidos, esta posição é identificada como uma posição que é improvável de ser necessária para ligação de antígeno. Ao invés, se uma posição de CDR conserva ligação em somente uma pequena percentagem de substituições, esta posição é identificada como uma posição que é importante para a função de CDR. Portanto, os métodos de mutagênese de triagem de bibliotecas geram informação referente às posições nas CDRs que podem ser alteradas para muitos aminoácido diferentes (inclusive todos os 20 aminoácidos), e posições nas CDRs as quais não podem ser alteradas ou as quais somente podem ser alteradas para uns poucos aminoácidos. Este aspecto é discutido e exemplificado no Exemplo 1.

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

A segunda biblioteca é triada ou selecionada para membros da biblioteca com afinidade de ligação aprimorada e/ou alterada usando qualquer método conhecido na técnica, inclusive triagem usando análise de ressonância de plasmon superficial BIAcore, e seleção usando qualquer método

conhecido na técnica para seleção, inclusive "display" de fago, "display" de levedura, e "display" de ribossoma.

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

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

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

O uso de pequenas bibliotecas, nas quais cada posição pode ser randomizada (em algumas modalidades, uma de cada vez), permite triagem de mutantes de substituição usando métodos sensíveis tais como BIAcore os quais proporcionam informação cinética detalhada. Métodos de triagem geralmente não são práticos quando são triadas bibliotecas maiores. Ao invés, métodos de seleção, tais como "display" de fago, "display" de levedura, e "display" de ribossoma, são comumente usados para identificar clones que conservam ligação. "display" de fago e ensaios ELISA podem depender fortemente da concentração da amostra de proteínas preparada a partir do clone, e portanto tendem a ser fortemente tendenciosos para clones que têm aumento da expressão, aumento da estabilidade, ou redução da toxicidade, ao invés de identificar clones com aumento da afinidade de ligação. Além disso, diferenças no nível de expressão dos clones podem mascarar pequenas melhoras na afinidade de ligação. Estas desvantagens são particularmente agudas quando um anticorpo com alta afinidade de ligação é usado como a material de partida, porque devem ser usados níveis muito baixos de antígeno de modo à triagem ser sufficientemente estringente.

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

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

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

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

EXEMPLOS

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

A. Métodos gerais

Foram usados os métodos gerais seguintes neste exemplo.

Produção de biblioteca

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

Preparação de Fab em pequena escala

A expressão em pequena escala em lâminas de 96 cavidades foi otimizada para triagem de bibliotecas de Fab. Iniciando a partir de *E. coli* transformada com uma biblioteca de Fab, foram escolhidas colônias para inocular tanto uma lâmina mestre (agar LB+Ampicillin (50 µg/ml) + 2% de Glicose) e uma lâmina de trabalho (2 ml/cavidade, 96 cavidade/lâmina contendo 1,5 mL de LB+Ampicillin (50 µg/ml) + 2% de Glicose). Ambas as lâminas foram cultivadas a 30°C por 8-12 horas. A lâmina mestre foi armazenada a 4°C e as células da lâmina de trabalho foram peletizadas a 5000 rpm e ressuspendidas com 1 mL de LB+Ampicillin (50 µg/ml)+ 1 mM de IPTG para induzir a expressão de Fabs. As células foram colhidas por centrifugação depois de tempo de expressão de 5 h a 30°C, em seguida ressuspendidas em 500 µL de tampão HBS-EP (tampão de 100 mM de HEPES pH 7.4, 150

mM de NaCl, 0,005% de P20, 3 mM de EDTA). Foi obtida lise de células ressuspendidas em HBS-EP por um ciclo de congelamento (-80°C) em seguida degelando a 37°C. Os lisados celulares foram centrifugados a 5000 rpm por 30 min para separar fragmentos celulares de sobrenadantes contendo Fabs. Os sobrenadantes foram em seguida injetados no equipamento de ressonância de plasmon BIAcore para obter informação de afinidade para cada Fab. Clones expressando Fabs foram resgatados da lâmina mestre para seqüenciar o DNA e para produção de Fab em grande escala e caracterização detalhada conforme descrito abaixo.

Preparação de Fab em grande escala

Para obter parâmetros cinéticos detalhados, Fabs foram expressados e purificados de grandes culturas. Frascos de Erlenmeyer contendo 200 mL de LB+Ampicillin (50 µg/ml) + 2% de Glicose foram inoculados com 5 mL de cultura de um dia para o outro de um clone de *E. coli* expressando Fab selecionado. Os clones foram incubados a 30°C até uma OD_{550nm} de 1,0 ser atingida e em seguida induzidos substituindo o meio por 200 ml, de LB+Ampicillin (50 µg/ml) + 1 mM de IPTG. Depois de tempo de expressão de 5 horas a 30°C, as células foram peletizadas por centrifugação, em seguida ressuspendidas em 10 mL de PBS (pH 8). A lise das células foi obtida por dois ciclos de congelamento / decongelamento (a -80°C e 37°C, respectivamente). O sobrenadante dos lisados celulares foram carregados sobre colunas de Ni-NTA superflow sepharose (Qiagen, Valencia. CA) equilibradas com PBS, pH 8, em seguida lavadas com 5 volumes de coluna de PBS, pH 8. Fabs individuais elutriados em diferentes frações com PBS (pH 8) + 300 mM de Imidazol. Frações contendo Fabs foram reunidas e dializadas em PBS, em seguida quantificadas por ELISA antes de caracterização de afinidade.

Preparação de anticorpo total

Para expressão de anticorpos totais, regiões variáveis de cadeia pesada e leve foram clonados em 2 vetores de expressão de mamíferos (Eb.911.E3 ou Eb.pur.911.3E para cadeia leve e Db.911.3E para cadeia pesada; descritos aqui) e transfectados usando lipofectemina em células HEK

293 para expressão transitória. Os anticorpos foram purificado usando proteína A usando métodos de rotina.

Ensaio Biacore

As afinidades de Fabs anti-NGF e anticorpos monoclonais foram determinadas usando o sistema de ressonância de plasmon superficial BIAcore3000™ (SPR) (BIAcore, INC, Piscaway NJ). Chips CM5 foram ativados com cloridreto de N-etila-N'-(3-dimetilaminopropila)-carbodimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. NGF humano foi diluído em 10 mM de acetato de sódio pH 4.0 e injetado sobre o chip ativado em uma concentração de 0,005 mg/mL. Usando tempo de fluxo variável através dos canais de chips individuais, foram obitdas duas faixas de densidade de antígeno: 100 a 200 unidades de resposta (RU) para estudos cinéticos detalhados e 500 a 600 RU para ensaios de triagem. O chip foi bloqueado com etanolamina. Estudos de regeneração mostraram que uma mistura de tampão de elutriação Pierce (Product No. 21004, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) e 4 M de NaCl (2:1) removeu de modo eficaz o Fab ligado ao mesmo tempo mantendo a atividade de hNGF sobre o chip por mais de 200 injeções. Tampão HBS-EP (0,01M de HEPES, pH 7.4, 0,15 NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% de Tensoativo P29) foi usado como tampão de funcionamento para todos os ensaios BIAcore.

Ensaio de triagem

Um ensaio de triagem BIAcore foi otimizado para determinar a afinidade de clones Fab de bibliotecas. Os sobrenadantes de pequenos lisados de cultura foram injetados em 50 µl/min por 2 min. Foram usados tempos de dissociação de 10 a 15 minutos para determinação de um único índice de dissociação exponencial ("koff") usando software de BIAevaluation. Amostras que mostraram índices "koff" dentro do mesmo alcance que o modelo usado para criar a biblioteca (clone 8L2-6D5, "koff" $1x10^{-3}$ s^{-1}) foram injetados para confirmação e tempos de dissociação de até 45 min foram permitidos para obter melhores valores de "koff". Clones apresentando valores aprimorados de (menores) "koff" foram expressados em grande escala e parâmetros cinéticos totais, k_{on} e "koff", foram determinados sobre proteína

purificada. O ensaio foi capaz de detectar diferenças em afinidade que foram de cerca de 2 vezes ou maiores.

Ensaio de determinação de afinidade

Diluições seriais (0,1-10x K_D estimada) de amostras de Fab purificadas foram injetadas por 1 min a 100 µL/min e foram permitidos tempos de dissociação de até 2h. As concentrações das proteínas Fab foram determinadas por ELISA e/ou eletroforese SDS-PAGE usando como um padrão um Fab de concentração conhecida (conforme determinado por análise de aminoácidos). Os índices de associação cinética (k_{on}) e índices de dissociação ("koff") foram obtidos simultaneamente ajustando os dados para um modelo de ligação de Langmuir a 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) usando o programa de BIAevaluation. Os valores da constante de dissociação de equilíbrio (K_D) foram calculados como "koff"/k_{on}.

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

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

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

(1) Preparação de modelo enxertado com CDR. As CDRs estendidas de cadeia leve do anticorpo 911 (isto é, inclusive tanto as regiões CDR de Kabat e de Chothia) foram enxertados nas seqüências aceitadoras de linhagem germinativa humana O8 com JK2 e as CDRs de cadeia pesada estendidas do anticorpo 911 foram enxertadas na seqüência aceitadora de

linhagem germinativa humana VH4-59 com JH4. As seqüências de aminoácidos das seqüências aceitadoras de linhagem germinativa humana são mostradas nas Figuras 1A e 1B. A numeração de aminoácidos é seqüencial. Usando as estruturas de proteína mencionadas acima, foram desenhadas seqüências de DNA para genes sintéticos codificando estrutura humana com as CDRs murinas. Estes domínios variáveis humanizados de cadeia pesada e leve foram denominados hVH e hVL respectivamente. Os códons foram otimizados para E. coli e uso em hamster. Vários oligonucleotídeos de sobreposição (69 a 90 bases de extensão) se estendendo toda a extensão do hVL e hVH com dois iniciadores flanqueantes curtos para cada cadeia foram usados para sintetizar separadamente os dois genes por PCR recursiva essencialmente conforme descrito em Prodromou et al, (1992) *Protein Eng* 5(8): 827-9. Fragmentos de DNA resultantes da extensão correta foram purificados por gel e em seguida clonados em um plasmídeo de expressão bicistrônico de E. coli (resistente a ampicilina). A expressão dos anticorpos estava sob controle de um promotor lacZ indutível por IPTG similar ao descrito em Barbas (2001) Phage "display": a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press (veja Vector pComb3X, at pg 2.10), no entanto, modificações incluíram adição e expressão dos seguintes domínios adicionais: o domínio constante de cadeia leve Capa humano (veja GenBank Accession No. CAA09181) e o domínio constante CHI de imunoglobulina humana IgG2a (GenBank Accession No. P01859).

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

(2) Introdução de uma mutação de ponto na seqüência de estrutura. A substituição V71K foi introduzida na cadeia pesada enxertada com CDR usando mutagênese sítio dirigida por PCR recombinante conforme descrito em Innis et al, (1995) PCR strategies, San Diego, Academic Press. Esta substituição substituiu o resíduo de estrutura humana com o resíduo de

estrutura de camundongo correspondente. O anticorpo resultante foi denominado 8L2-6D5, e a seqüência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 8L2-6D5 é mostrada na Figura 1A. A afinidade de 8L2-6D5 foi determinada usando análise BIAcore conforme descrito acima. O fragmento Fab de 8L2-6D5 ligou NGF humano com uma Kd de cerca de 15 nM. 8L2-6D5 foi escolhido como modelo para maturação de afinidade.

(3) Humanização e maturação de afinidade de CDRs L1, L2, H1 e H2. As CDRs L1, L2, H1 e H2 foram submetidas a humanização e maturação de afinidade. Foram identificadas posições de aminoácidos nas CDRs L1, L2, H1, e H2 que não são essenciais para a estrutura das CDRs com base na estrutura canônica de Chothia (veja Al-Lazikani et al (1997) *J. Mol. Biol.* 273(4):927-48); e submetidas a randomização como se segue. Duas bibliotecas foram preparadas contendo as mutações de cadeia leve ou mutações de cadeia pesada mostradas na Tabela 2, e a CDR L3 enxertada (de camundongo) ou CDR H3, respectivamente, usando mutagênese de cassete de PCR com oligonucleotídeos degenerados conforme descrito em Kay et al. (1996), Phage "display" of peptides and proteins : a laboratory manual, San Diego, Academic Press, usando códons de doping conforme descrito em Balint et al, (1993) *Gene* 137(1):109-18). Geralmente, os resíduos aminoácidos foram alterados para resíduos que são mais comuns em anticorpos humanos, com base em alinhamentos das seqüências de aminoácidos de cadeia pesada e de cadeia leve do anticorpo 911 com seqüências de anticorpo de linhagem germinativa humana. O resíduo aminoácido tipo selvagem (não substituído) também foi representado na biblioteca com a exceção do resíduo CDR H2 50, uma metionina, na qual a metionina tipo selvagem não estava representada na biblioteca. Resíduos metionina são submetidos a oxidação; portanto, espera-se que a substituição do resíduo melhore a estabilidade do anticorpo resultante. As bibliotecas de Fabs foram clonadas no vetor pComb3X mais as regiões CH1 e Cκ humanas, conforme descrito acima.

Tabela 2:

1. Biblioteca H1/H2 de cadeia pesada:

CDR-H1

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

N35 foi alterado para N, T, S, ou Y

CDR-H2

M50 foi alterado para todos os 20 aminoácidos naturais

A62 foi alterado para A ou S

L63 foi alterado para L ou V

2. Biblioteca L1/L2 de cadeia leve

CDR-L1

S26 foi alterado para S, A, V, ou F

D28 foi alterado para D, A, S, ou Y

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

CDR-L2

Y50 foi alterado para Y, D, A, ou S

I51 foi alterado para I, T, A, ou V

F54 foi alterado para F ou L

S56 foi alterado para S e T

Para experimentos de triagem de afinidade, cada biblioteca foi adicionalmente pareada com a cadeia leve ou pesada enxertada com CDR correspondente (por exemplo, a biblioteca H1/H2 foi pareada com cadeia leve enxertada com CDR), o anticorpo foi expressado, e a afinidade a NGF humano dos clones individuais foi triada usando o sistema de ressonância de plasmon superficial (SPR) BIACORE (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ) de acordo com as instruções do fabricantge e conforme descrito acima. Foram determinados "koff", k_{on} e K_D. Clones de anticorpos foram classificados com base nos índices de "koff" , uma vez que geralmente a maior parte das variações na afinidade é vista nos índices de "koff", e adicionalmente porque os índices de "koff" são independentes da concentração de anticorpos.

A seqüência de clones que ligou foi determinada e a seqüência de clones que ligou é mostrada na tabela 3.

Tabela 3: Seqüências de aminoácidos L1 e L2, seqüências de aminoácidos H1 e H2, e dados cinéticos para clones que ligaram depois de triagem de afinidade de clones das bibliotecas H1/H2 ou L1/L2.

Dados cinéticos de 1-2 mutantes de CDR				
Clones de biblioteca de cadeia leve Pareados com Cadeia pesada 8L2	seqüência de AA CDRL1	seqüência de AA CDRL2	"koff" (s-1)	*K_D (nM)
8L2-6D5 (controle)	RASQDISNHLN (SEQ ID NO: 12)	YISRFHS (SEQ ID NO: 13)	**1e-3	25
L129	RASQSISNNLN (SEQ ID NO: 18)	YTSRFHS (SEQ ID NO: 19)	4.5e-4	11
L208	RASQYISNHLN (SEQ ID NO: 20)	YTSRFHS (SEQ ID NO: 21)	4.6e-4	11
L97	RASQSISNQLN (SEQ ID NO: 22)	YVSRFHS (SEQ ID NO: 23)	5.6e-4	14
L81	RAFQAISNQLN (SEQ ID NO: 24)	YISRFHT (SEQ ID NO: 25)	7.4e-4	18
L6	RAFQSISNQLN (SEQ ID NO: 26)	YASRFHS (SEQ ID NO: 27)	8.2e-4	20
Clones de biblioteca de cadeia pesada Pareados com Cadeia leve 6D5	seqüência de AA CDRH1	seqüência de AA CDRH2	"koff" (s-1)	*K_D (nM)
8L2-6D5 (controle)	GFSLIGYDIN (SEQ ID NO: 9)	MIWGDGTTDYN SAL (SEQ ID NO: 10)	1e-3	25
H109	GFSLIGYDSN (SEQ ID NO: 28)	IIWGDGTTDYN-SAL (SEQ ID NO: 29)	1.6e-4	4

Dados cinéticos de 1-2 mutantes de CDR				
H19	GFSLIGYDLN (SEQ ID NO: 30)	IIWGDGTTDYN-SAV (SEQ ID NO: 31)	2.4e-4	6
H222	GFSLIGYDVT (SEQ ID NO: 32)	GIWGDGTTDYN SAV (SEQ ID NO: 33)	3.8e-4	9.5
H225	GFSLIGYDVT (SEQ ID NO: 34)	GIWGDGTTDYN SSV (SEQ ID NO: 35)	3.8e-4	9.5
H18	GFSLIGYDAT (SEQ ID NO: 36)	GIWGDGTTDYN SAV (SEQ ID NO: 37)	4.2e-4	10.5
H9	GFSLIGYDVS (SEQ ID NO: 38)	I-IWGDGTTDYNS SV (SEQ ID NO: 39)	4.1e-4	10.2
H227	GFSLIGYDIS (SEQ ID NO: 40)	QIWGDGTTDYN SSV (SEQ ID NO: 41)	5.4e-4	13.5
H17	GFSLIGYDAS (SEQ ID NO: 42)	GIWGDGTTDYN SSV (SEQ ID NO: 43)	6.1e-4	15.2
H28	GFSLIGYDST (SEQ ID NO: 44)	SIWGDGTTDYN SAL (SEQ ID NO: 45)	7.5e-4	18.7

AA em negrito foram randomizados conforme indicado acima

*KD calculada usando k_{on} 4e4 $M^{-1}s^{-1}$

**Por conveniência, "e" conforme usado aqui, denota "x10." Portanto, 4e4 de modo intercambiável significa $4x10^4$.

CDRs contendo as seguintes substituições conservaram ligação:

CDR-H1

I34: S, L, V, I e A ligaram.

N35: N, T e S ligaram.

CDR-H2

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

A62: A e S ligaram.

L63: L e V ligaram.

CDR-L1

S26: S, e F ligaram.

D28: D, S, A, Y ligaram.

H32: H, N, Q ligaram.

CDR-L2

Y50: Y ligou.

I51: I, T, V, A, ligaram.

F54 : F ligou

S56: S e T ligaram

CDRs contendo as seguintes substituições foram selecionadas geralmente com base na afinidade de ligação e combinadas em um único clone, denominado H19-L129:

CDR-H1: I34L; N35N (sem alteração)

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

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

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

Estas mutações foram combinadas (amplificando as cadeias H e L por PCR, cortando os produtos de PCR e vetor (pRN8) com enzima de restrição e realizando uma ligação de 3 fragmentos) em um único clone, denominado H19-L129, o qual também incluiu as CDRs H3 e L3 enxertadas. A seqüência das regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve de H19-L129 é mostrada nas Figuras 1A e 1B, e a Tabela 4 mostra a seqüência de aminoácidos das CDRs L1, L2, H1 e H2. H19-L129 ligou NGF com uma KD de cerca de 1 nM, conforme determinado usando análise BIAcore conforme descrito aqui.

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

Clone de combinação : mutações em CDRs H1, H2, L1, L2	CDRL1 CDRH1 seqüência de AAs	CDRL2 CDRH2 seqüência de AAs	"koff" (s-1)	*K_D (nM)
H19-L129	CDR-L1: RASQSISNNLN (SEQ ID NO: 18) CDR H1: GFSLIGYDLN (SEQ ID NO: 30)	CDRL2: YTSRFHS (SEQ ID NO: 19) CDR-H2: IIWGDGTTDYNSAV (SEQ ID NO: 31)	1.1e-4	3.5

*KD calculada usando k_{on} 4e4 $M^{-1}s^{-1}$

(4) Maturação por afinidade de CDRs H3 e L3. A maturação de afinidade das CDRs H3 e L3 foi realizada em duas etapas. Primeiro, em um processo denominado "mutagênese de varredura de bibliotecas", cada resíduo aminoácido em H3 e L3 foi individualmente pré-triado de modo a identificar posições de aminoácido nas quais uma mutação resultou em aumento da afinidade de ligação para NGF humano. Com base nos resultados da mutagênese de varredura de bibliotecas (também denominada "análise por randomização de biblioteca pequena"), um subgrupo de posições de aminoácidos em H3 e L3 foram selecionadas para preparação da biblioteca de maturação de afinidade, e a biblioteca de maturação de afinidade foi triada para afinidade a NGF humano usando análise BIAcore conforme descrito aqui. Reconhece-se que estas técnicas podem ser aplicadas de modo geral.

(a) Mutagênese de varredura de bibliotecas

Cada posição de aminoácido nas CDRs H3 e L3 foi individualmente pré-triada para substituições as quais resultaram em aumento da afinidade de ligação a NGF humano. A freqüência das substituições de aminoácidos em qualquer dada posição que resultou em ligação aprimorada, na mesma ligação, pior ligação ou nenhuma ligação proporcionou informação relativa a posições nas CDRs que podem ser alteradas para muitos aminoácidos diferentes (inclusive todos os 20 aminoácidos), e posições nas CDRs

as quais não podem ser alteradas ou as quais podem ser somente alteradas por uns poucos aminoácidos. Também foram identificadas substituições de aminoácidos resultando em aumento da afinidade de ligação. Com base nos resultados desta triagem, um subgrupo de posições de aminoácido nas CDRs H3 e L3 foram selecionadas para preparação de uma biblioteca de maturação de afinidade.

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

20 a 80 clones de cada biblioteca pequena foram triados usando análise BIAcore conforme descrito aqui. As amostras foram analisadas simultaneamente por BIAcore por afinidade de ligação a NGF em um canal do chip BIAcore e para presença de Fab por ligação a um anticorpo pentahistag em outro canal do chip sensor, para detectar a etiqueta his no C término da cadeia pesada. Clones que expressavam proteína foram classificados como tendo a mesma afinidade, pior afinidade, melhor afinidade ou nenhuma ligação, usando "koff" para classificar: Os resultados desta análise são mostrados na Tabela 5.

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

	mutação	melhor 1e-3<	mesmo ≥ 1e-3, 2e-3<	Pior ≥ 2e-3	Nenhuma ligação	Percentagem de AAs que conservam a capacidade de ligação
Cadeia leve						
	L_S91X	13%	40%	20%	26%	50%
	L_K92X		100%			~100%
	L_T93X		93%	7%		93%
	L_L94X		40%	60%		40%
	L_Y96X		13%	80%	7%	13%
Cadeia pesada						
	H_G98X		50%	37%	13%	50%
	H_G99X		46%	54%		46%
	H Y100X		26%		73%	26%
	H Y101X	6%		12%	82%	6%
	H_Y102X		7%	25	68%	7%
	H_G103X	4%	21%	16%	58%	25%
	H_T104X		20%	30%	50%	20%
	H_S105X	10%	25%	26%	39%	35%
	H_Y106X		75%	25%		75%
	H_Y107X		8%	46%	46%	8%
	H_F108X		23%	27%	50%	23%
	H_D109X		29%	46%	25%	29%
	H_Y110X		90%	5%	5%	90%

A seqüência de todos os clones com aprimorada afinidade foi determinada, revelando a freqüência e a identidade de substituições de aminoácidos que resultaram em aumento da afinidade. Além disso, uns poucos

clones que conservaram uma afinidade similar ao clone 8I2-6D5 foram selecionados entre cada biblioteca, de modo a determinar substituições de seqüências de aminoácidos que foram permitidas em uma dada posição, muito embora a substituição não tenha necessariamente aumentado a afinidade de ligação. Os resultados desta análise são resumidos na Tabela 6.

Tabela 6.

mutações CDR H3 (modelo 8L2-6D5, inclusive anticorpo 911 CDR-H3 seqüência de aminoácidos: GGYYYGTSYYFDY (SEQ ID NO: 11)	"koff" (s-1) 1E-3	K_D^* (nM) 25
Y100L	1.2E-3	30
Y100R	1.1E-3	27
Y101W	5.6E-4	14
G103A	1.6E-4	4
T104S	2.2E-3	55
S105A	5.1E-4	13
S105T	6.4E-4	16
Y106R	1.6E-3	40
Y106T	2.0E-3	50
Y106M	2.7E-3	67
Y107F	1.4E-3	35
F108W	1.22E-3	30
D109N	1.5E-3	37
D109G	1E-3	25
Y110K	1.4E-3	35
Y110S	1.5E-3	37
Y110R	1.6E-3	40
Y110T	1.7E-3	42
mutações CDR L3 (modelo 8L2-6D5, inclusive CDR-L3 seqüência de aminoácidos (não substituídos) selvagem :QQSKTLPYT (SEQ ID NO: _14)	"koff" (s-1) 1E-3	K_D^* (nM) 25
S91E	2.5E-4	6
Y96R	1.7E-3	42

*KD calculada usando k_{on} 4e4 $M^{-1}s^{-1}$

Várias mutações resultaram em aumento da afinidade de ligação. No mínimo as seguintes mutações resultaram em afinidade de ligação

significativamente aumentada comparada com o modelo 8L2-6D5: (H_Y101W (CDR seqüência GGYWYGTSYYFDY (SEQ ID NO: 46)); H_S105A (CDR seqüência GGYYYGTAYYFDY (SEQ ID NO: 47)); H_S105T (CDR seqüência GGYYYGTTYYFDY (SEQ ID NO: 48)); H_G103A (CDR seqüência GGYYYATSYYFDY (SEQ ID NO: 49); e L_S91E (CDR seqüência QQEKTLPYT (SEQ ID NO: 50)).

Os resultados deste experimento foram usados para orientar a seleção de posições de aminoácido para produção das bibliotecas de maturação de afinidade.

Este experimento também proporcionou informação relativa à freqüência de substituições de aminoácidos em qualquer dada posição que resultou em ligação aprimorada, na mesma ligação, pior ligação ou nenhuma ligação, conforme mostrado na Tabela 5. Esta informação permitiu a identificação de posições de aminoácidos nas CDRs que podem ser alteradas para muitos aminoácidos diferentes (inclusive todos os 20 aminoácidos), e posições nas CDRs as quais podem ser alteradas para uns poucos aminoácidos ou muito poucos aminoácidos (em algumas modalidades, nenhum aminoácido). Estes resultados também demonstraram substituições de aminoácidos que aumentaram a afinidade de ligação.

(b) Maturação de afinidade

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

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

Tabela 7. Resíduos aminoácido em H3 e L3 selecionados para substituição

e os aminoácidos que foram substituídos em cada posição

CDR-H3:

Y101 foi alterado para Y e W, C. (Notar que C foi incluído porque o uso do códon TRS em um oligonucleotídeo degenerado também gerou o códon C).

G103 foi alterado para A ,P, S

CDR-L3:

S91 foi alterado para E.

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

Cada polipeptídeo foi expressado como um Fab, e a afinidade para NGF humano de 96 clones individuais foi triada para cada biblioteca usando análise BIACORE de acordo com as instruções do fabricante e descrita acima. Os resultados desta análise são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8.

MUTAÇÕES DE COMBINAÇÃO CDR L3 H3 (modelo 8L2-6D5)	"koff" (s-1) 1E-3	K_D^* (nM) 25
L_S91E; L_K92A (CDR seqüência QQEATLPYT (SEQ ID NO: 51)) H_Y101W; H_G103A (CDR seqüência GGYWYATSYYFDY (SEQ ID NO: 52))	5.5E-4	13
L_S91E; L_K92R (CDR seqüência QQERTLPYT (SEQ ID NO: 53)) H_Y101W; H_G103A (CDR seqüência GGYWYATSYYFDY (SEQ ID NO: 54))	1.0E-4	25
MUTAÇÕES DE COMBINAÇÃO CDR L3 H3 (modelo H19-L129, H1H2L1L2 maduro)	"koff" (s-1) 1.1e-4	K_D^* (nM)

MUTAÇÕES DE COMBINAÇÃO CDR L3 H3 (modelo 8L2-6D5)	"koff" (s-1) 1E-3	K_D^* (nM) 25
L_S91E; L_K92H (CDR seqüência QQEHTLPYT (SEQ ID NO: 55)) H_Y101W; H_G103A (CDR seqüência GGYWYATSYYFDY (SEQ ID NO: 56)) (CLONE E3)	1.2E-5	0,3
L_S91E; L_K92S (CDR seqüência QQESTLPYT (SEQ ID NO: 57)) H_Y101W; H_G103S (CDR seqüência GGYWYSTSYYFDY (SEQ ID NO: 58))	4.7E-5	1,1
L_S91E; L_K92K (CDR seqüência QQEKTLPYT (SEQ ID NO: 59)) H_Y101Y; H_G103A (CDR seqüência GGYYYATSYYFDY (SEQ ID NO: 60))	2E-5	0,5
L_S91E; L_K92R (CDR seqüência QQERTLPYT (SEQ ID NO: 61)) H_Y101W; H_G103A (CDR seqüência GGYWYATSYYFDY (SEQ ID NO: 62)) (CLONE 3C)	1.4E-5	0,35
L_S91E; L_K92R (CDR seqüência QQERTLPYT (SEQ ID NO: 63)) H_Y101Y; H_G103A (CDR seqüência GGYYYATSYYFDY (SEQ ID NO: 64))	1.5E-5	0,37

*KD calculada usando k_{on} 4e4 $M^{-1}s^{-1}$

Com base na afinidade de ligação, os melhores clones, E3 (de modo intercambiável denominado "3E") e 3C, foram selecionados para caracterização adicional. E3 compreendeu as seguintes substituições de CDR: CDR-H3: Y101W, G103A; e CDR-L3: S91E, K92H, as quais foram combinadas em um único clone o qual também incluiu as seguintes mutações L1, L2, H1 e H2 :

CDR-H1: I34L;

CDR-H2: M50I; L63V;

CDR-L1: D28S; H32N;

CDR-L2: I51T.

A seqüência das regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve de E3 é mostrada nas Figuras 1A e 1B. 3C compreendeu as seguintes substituições de CDR : CDR-L3: S91E; K92R; CDRH3: Y101W; G103A, as quais foram combinadas em um único clone o qual também incluiu as seguintes mutações L1, L2, H1 e H2 descritas para o clone 3E.

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

As afinidades de ligação a NGF humano dos Fabs E3 e 3C foram medidas usando análise BIAcore de acordo com as instruções do fabricante e conforme descrito acima, exceto que 100 RU NGF foi usado sobre o chip para prevenir um efeito de religação. Em resumo, várias concentrações de anticorpos (Fabs) foram injetados por 2 minutos sobre um chip CM5 com 100 RU de NGF humano imobilizado sobre o mesmo, e permitiu dissociar por 1800 segundos. Anticorpo de camundongo 911 (Fab) foi analisado como um controle. Os dados foram analisados usando o software BIAevaluation seguindo as instruções do fabricante. Os resultados da análise do anticorpo E3 e 911 são mostrados nas Figuras 9 e 10. E3 ligou NGF humano com uma KD de cerca de 0,07 nM (e com uma kon de cerca de 6,0e5 M-1s-1, e um "koff" de cerca de 4,2e-5 s-1). 3C ligou NGF humano com uma KD de cerca de 0,35 nM (com um "koff" de cerca de 1.4E-5). Em contraste, anticorpo de camundongo 911 ligou NGF com uma KD de 3,7 nM, "koff" de $8,4x10^{-5}s^{-1}$ e k_{on} de $2,2x10^{4}Ms^{-1}$.

O anticorpo E3 (denominado de modo intercambiável 3E) foi selecionado por análise adicional com base na afinidade de alta ligação. Para testar a capacidade de E3 para prevenir a interação de NGF com os receptores de NGF trkA e p75, 2,5 nM de NGF humano foi pré-misturado e incubado

por uma hora com 0 a 50 nM do anticorpo E3 (Fab). Depois da incubação, foram injetadas amostras a 10 ul/minuto sobre um chip BIAcore CM5 contendo 260 RU de p75 (canal 2) e 600 RU de trkA (canal 3), e foi determinada a percentagem de ligação. Os resultados desta análise são mostrados na Figura 11. Concentrações aumentadas de Fab E3 bloquearam a interação de NGF tanto com p75 quanto com trkA, conforme mostrado por sinal reduzido (medido em RU), indicando que Fab E3 bloqueia a interação de NGF humano com tanto trkA quanto p75. Quando a concentração de anticorpo E3 (Fab) foi igual à concentração de NGF (a cerca de 2,5 nM de concentração de NGF), não foi observada nenhuma ligação de NGF (conforme mostrado por um sinal de zero). O fato de ter ocorrido zero por cento de ligação NGF-receptor quando a concentração de NGF foi igual à concentração de anticorpo 3E sugeriu que 2,5 nM de NGF era no mínimo dez vezes maior do que a kD de E3 para NGF e em equilíbrio.

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

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

O ensaio de sobrevida foi conduzido como se segue: camundongos fêmeas Swiss Webster prenhas combinadas por tempo foram eutanizadas por inalação de CO2. As trompas uterinas foram removidas e os embriões no estágio embrionário E13.5 foram extraídos e decapitados. Os gânglios trigeminais foram dissecados usando agulhas de tungstênio estimu-

ladas eletroliticamente. Os gânglios foram em seguida tripsinizados, dissociados mecanicamente e laminados em uma densidade de 200 a 300 células por cavidade em meio Ivire de soro definido em lâminas de 96 cavidades revestidas com poli-L-ornitina e laminina.

A atividade de bloqueio de anticorpos ou Fabs anti-NGF foi avaliada adicionando aos neurônios trigeminais doses variáveis de anticorpos anti-NGF Mab 911 (Fab), 8L2-6D5; H19-L129; E3 e 3C; e NGF humano ou de rato nas seguintes concentrações: 0,4 ng/ml (~15 pM; esta concentração representou uma concentração saturante de NGF para sobrevida) e 0,04 ng/ml (~1,5 pM; esta concentração é em torno de IC50). Depois de 48 horas em cultura, as células foram submetidas a um protocolo de imunocitoquímica automatizado realizado em uma estação de trabalho de manipulação de líquido Biomek FX (Beckman Coulter) como se segue: fixação usando 4% de formaldeído, 5% de sacarose, e PBS; permeabilização usando 0,3% de Triton X-100 em PBS); bloqueio de sítios de ligação inespecífica usando 5% de soro de cabra normal, 0,11% de BSA em PBS; e incubação seqüencial com alguns anticorpos primáios e secundários para detectar neurônios. O anticorpo primário foi anticorpo policlonal de coelho contra o produto genético protéico 89.5 (PGP9.5, Chemicon), um marcador fenotípico neuronal estabelecido. O anticorpo secundário foi anti-coelho de cabra Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), junto com o corante nuclear Hoechst 33342 (Molecular Probes) para marcar os núcleos de todas as células presentes na cultura. A aquisição de imagem e a análise de imagem foram realizadas em um Discovery-I/GenII Imager (Universal Imaging Corporation). As imagens foram automaticamente adquiridas em dois comprimentos de onda por Alexa Fluor 488 e Hoechst 33342, com a coloração nuclear sendo usada como ponto de referência para o sistema de auto-foco baseado nas imagens do Imager, uma vez que a coloração nuclear está presente em todas as cavidades. Objetivos apropriados e número de sítios estudados por imagens por cavidade foram selecionados para cobrir toda a superfície de cada cavidade. Análise de imagens automatizada foi estabelecida para contar o número de neurônios presentes em cada cavidade depois de 48 horas em cultura com base

em sua coloração específica com o anticorpo anti-PGP9.5. Cuidadoso limiar da imagem e aplicação de morfologia e filtro de seletividade à base da intensidade de fluorescência resultou em uma contagem precisa de neurônios por cavidade.

Os resultados deste experimento demonstraram que Fab E3 bloqueou a atividade de NGF com uma alta afinidade. Os resultados são mostrados nas Figuras 4 a 6, e na Tabela 9.

A Figura 4 é um gráfico mostrando a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de neurônios E13.5 na presença de concentração variável de NGF humano e de rato.

A Figura 5 é um gráfico comparando o efeito de bloqueio de NGF de vários Fabs na presença ou de 0,04 ng/ml de NGF humano (cerca de 1,5 pM; mostrado no painel inferior) ou de 0,4 ng/ml de NGF humano (cerca de 15 pM; mostrado no painel superior). 1,5 pM de NGF foi em torno da EC50 do NGF estimulando sobrevida, ao passo que 15 pM representou uma concentração saturante de NGF. A sobrevida de neurônios trigeminais de camundongo E13.5 em várias concentrações de Fab E3; Fab 911 murino; e Fab H19-L129 e Fab 8L2-6D5 foi avaliada conforme descrito acima. A IC50 (em pM) foi calculada para cada Fab em cada concentração de NGF, e é mostrada na Tabela 9. Fab E3 bloqueou fortemente a sobrevida de neurônios trigeminais dependente de NGF humano, com uma IC50 de cerca de 21 pM na presença de 15 pM de NGF humano, e uma IC50 de cerca de 1,2 pM na presença de 1,5 pM de NGF humano. Fabs 3C e H19-L129 também bloquearam fortemente a sobrevida de neurônios trigeminais dependente de NGF humano.

A Figura 6 é um gráfico comparando o efeito de bloqueio de NGF de vários Fabs na presença de ou 0,04 ng/ml de NGF de rato (cerca de 1,5 pM; mostrado no painel inferior) de ou 0,4 ng/ml de NGF de rato (cerca de 15 pM; mostrado no painel superior). 1,5 pM de NGF foi em torno da EC50, ao passo que 15 pM representou uma concentração saturante de NGF. A sobrevida de neurônios trigeminais de camundongo E13.5 em várias concentrações de Fab E3; Fab 911 murino; e Fab H19-L129 e 8L2-6D5 foi

avaliado conforme descrito acima. A EC50 (em pM) foi calculada para cada Fab em cada concentração de NGF, e é mostrada na Tabela 9. Fab E3 bloqueou fortemente a sobrevida de neurônios trigeminais dependente de NGF humano, com uma IC50 de cerca de 31,6 pM na presença de 15 pM de NGF de rato, e uma IC50 de cerca de 1,3 pM na presença de 1,5 pM de NGF de rato. Fabs 3C e H19-L129 também bloquearam fortemente a sobrevida de neurônios trigeminais dependente de NGF de rato.

Tabela 9:

NGF Humano	IC50 (na presença de 15 pM de NGF)	IC50 (na presença de 1.5 pM de NGF)
	pM	pM
Fab 8L2-6D5	1580,5	461,8
Fab H19-L129	60,1	9,6
Fab 3E	<21,0	<1,2
Fab 3C	80,9	5,6
Fab 911	322,3	63,5
NGF de Rato	IC50 (15 pM de NGF)	IC50 (1,5 pM de NGF)
	pM	pM
Fab 8L2-6D5	730,3	169,4
Fab H19-L129	31,0	6,0
Fab 3E	<8,3	<1,3
Fab 3C	31,6	6,0
Fab 911	161,0	34,6

Em um experimento diferente, foi comparado a capacidade do anticorpo total E3 e Fab 3E para inibir a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de neurônios E13.5 na presença de 0,4 ng/ml (concentração saturante) de NGF humano. Os resultados da análise são mostrados na Figura 12. O anticorpo total E3 e Fab 3E apresentou níveis similares de inibição da sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso quando a concentração de anticorpo total e Fab foram normalizadas para o número de sítios de ligação de NGF (Fab tem um sítio de ligação e anticorpo total tem

dois sítios de ligação). Estes resultados demonstraram que não houve efeito de avidez devido à ligação de um anticorpo total ao dímero de NGF.

Em outros experimentos, foi comparada a capacidade de várias concentrações (20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 0,0064, 0,00128, e 0,0 nM) do anticorpo E3, anticorpo 911, e uma imunoadesina de trkA receptor (consistindo no domínio extracelular do receptor de NGF trkA fundido com o domínio de imunoglobulina Fc, CH2-CH3) para inibir a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso de neurônios E13.5 na presença de 0,4 ng/ml (condições saturantes). Estes resultados são mostrados na Figura 13. Estes resultados demonstraram que o anticorpo E3 bloqueou NGF melhor do que ou o anticorpo 911 ou a trkA imunoadesina.

Exemplo 3: Avaliação da especificidade do anticorpo anti-NGF E3 usando ensaios de sobrevida de neurônios trigeminais e nodoso de camundongo

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

A capacidade do anticorpo E3 para bloquear especificamente a atividade de NGF também foi avaliada por medição da capacidade do anticorpo para inibir a sobrevida de neurônios E17 nodosos de camundongo na presença de concentrações saturantes de BDNF ou NT4/5. A sobrevida de neurônios nodosos é suportada por BDNF ou NT4/5; portanto, a sobrevida

destes neurônios é um ensaio sensível para avaliar a atividade de bloqueio de BDNF ou NT4/5 do anticorpo antagonista anti-NGF.

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

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

Neurônios nodosos E17 foram cultivados ou na ausência de fatores neurotróficos adicionados (controle negativo), ou com concentrações saturantes de BDNF (400 pM) (controle positivo) ou NT4/5 (400 pM) ou fator de crescimento não relacionado com NGF ILF (fator inibitório de interleucina). Altas concentrações de neurotrofinas foram usadas, uma vez que a meta deste experimento foi testar a especificidade dos anticorpos. Foram estabelecidas culturas em duplicata que incluíram variar novamente com e sem a adição de anticorpos E3 e 911. Depois de 48 horas em cultura o número total de neurônios sobreviventes em cada cavidade sob cada condição foi determinado por contagem manual usando um microscópio de contraste de fase.

Os resultados destes experimentos demonstraram que anticorpos E3 e 911 bloquearam completamente os efeitos estimuladores de so-

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

Os resultados destes experimentos são mostrados nas figuras 14, 15, 16, e 17. Os dados mostraram a percentagem da sobrevida média depois de 48 horas em cultura (± erro padrão da média, n = 3 para cada ponto dos dados) relativa à sobrevida vista no controle positivo para cada experimento (por exemplo, 100% de sobrevida de neurônios trigeminados cultivados na presença de concentração de NGF saturante, e 100 % de sobrevida de neurônios nodosos cultivados na presença de concentração de BDNF saturante, respectivamente). As Figuras 14-15 são gráficos mostrando que anticorpo antagonista anti-NGF E3 ou Fab E3 não inibiram a sobrevida promovida por NT3, e MSP, mesmo em concentrações de anticorpo tão elevadas quanto 200 nM. Em contraste, 20 nM do anticorpo E3 ou Fab 3E e Fab 911 bloquearam totalmente a sobrevida provocada por NGF. Anticorpo antagonista anti-NGF de camundongo 911 também foi testado, e foram observados resultados similares. Especificamente, a Figura 14 é um gráfico

mostrando comparação do efeito de várias concentrações (20 nM, 2 nM, ou 0,2 nM) de Fab E3 (denominado "3E" na figura) e anticorpo Fab 911 de camundongo sobre a sobrevida de neurônios trigeminais E18 na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "controle"), 400 pM de NGF (denominado "NGF-400pM), 10 nM de NT3 (denominado "NT3-10nM) ou 600 pM de MSP (denominado "MSP-600 pM). A Figura 15 é um gráfico representando comparação do efeito de várias concentrações (200 nM e 80 nM) de E3 Fab e anticorpo total e anticorpo de camundongo 911 anticorpo total e Fab da sobrevida de neurônios trigeminais E17 na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "nenhum fator"), 400 pM de NGF (denominado "NGF-400pM), 10 nM de NT3 (denominado "NT3-10nM) ou 600 pM de MSP (denominado "MSP-600 pM).

A Figura 16-17 são gráficos mostrando que anticorpo antagonista anti-NGF E3 ou Fab E3 não inibiram a sobrevida de neurônios nodosos E17 promovida por BDNF, NT4/5 ou LIF. Anticorpo antagonista anti-NGF 911 de camundongo também foi testado, e foram observados resultados similares. Especificamente, a Figura 16 é um gráfico mostrando comparação do efeito de várias concentrações (200 nM ou 80 nM) de anticorpo total E3 (denominado "3E na figura"), Fab E3, anticorpo total 911, ou Fab 911 sobre a sobrevida de neurônios nodosos E17 na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "nenhum fator"), 400 pM de BDNF (denominado "BDNF-400pM), 400 pM de NT4/5 (denominado "NT4/5-400pM), ou 2,5 nM de LIF (denominado "LIP-2.5 nM). A Figura 17 é um gráfico mostrando comparação do efeito de várias concentrações (200 nM, 20 nM, 2nM) de Fab E3 (denominado "3E na figura"), ou Fab 911 sobre a sobrevida de neurônios nodosos E17 na presença de nenhuma neurotrofina adicionada (denominado "controle"), 400 pM de BDNF (denominado "BDNF-400pM), 400 pM de NT4/5 (denominado "NT4/5-400pM), or 2.5 nM de LIF (denominado "LIP-2.5 nM).

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

Três vetores de expressão de mamíferos foram projetados e

construídos para uso na expressão do anticorpo E3 em células de mamífero.

O vetor Db.911.3E é um vetor de expressão compreendendo a região variável de cadeia pesada do anticorpo E3 e a região constante IgG2a humana, e é adequado para expressão transitória ou estável da cadeia pesada. Db.911.3E consiste em seqüências de nucleotídeos correspondentes às seguintes regiões: a região promotora de citomegalovírus murino (nucleotídeos 1-612); um íntron sintético (nucleotídeos 619-1507); a região codificante DHFR (nucleotídeos 707-1267); peptídeo de sinalização de hormônio de crescimento humano (nucleotídeos 1525-1602); região variável de cadeia pesada de anticorpo 3E (nucleotídeos 1603-1965); região constante de IgG2a de cadeia pesada humana contendo as seguintes mutações: A330P331 a S330S331 (numeração de aminoácidos com referência à seqüência IgG2a selvagem; veja Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624); sinal de poliadenilação tardio SV40 (nucleotídeos 2974-3217); região intensificadora de SV40 (nucleotídeos 3218-3463); região de fago f1 (nucleotídeos 3551-4006) e região codificante de beta lactamase (AmpR) (nucleotídeos 4443-5300). Db.911.3E foi depositado na ATCC em 8 de janeiro de 2003, e foi atribuído o No. de Acesso ATCC PTA-4895.

O vetor Eb.911.3E é um vetor de expressão compreendendo a região variável de cadeia leve do anticorpo E3 e a região constante de cadeia capa humana, e é adequado para expressão transitória da cadeia leve. Eb.911.3E consiste em seqüências de nucleotídeos correspondentes às seguintes regiões: a região promotora de citomegalovírus murino (nucleotídeos 1-612); íntron EF-1 humano (nucleotídeos 619-1142); peptídeo de sinalização de hormônio de crescimento humano (nucleotídeos 1173-1150); região variável de cadeia leve do anticorpo E3 (nucleotídeos 1251-1571); região constante de cadeia capa humana (nucleotídeos 1572-1892); sinal de poliadenilação tardio SV40 (nucleotídeos 1910-2153); região intensificadora de SV40 (nucleotídeos 2154-2399); região de fago f1 (nucleotídeos 2487-2942) e região codificante de beta lactamase (AmpR) (nucleotídeos 3379-4236). Eb.911.3E foi depositado na ATCC em 8 de janeiro de 2003, e foi atribuído o No. de Acesso ATCC PTA-4893.

O vetor Eb.pur.911.3E é um vetor de expressão compreendendo a região variável de cadeia leve do anticorpo E3 e a região constante capa humana, e é adequado para expressão estável da cadeia leve. Eb.pur.911.3E consiste em seqüências de nucleotídeos correspondentes às seguintes regiões: região promotora de citomegalovírus murino (nucleotídeos 1-612); íntron EF-1 humano (nucleotídeos 619-1758); região codificante do gene pac (puromycinR) (nucleotídeos 739-1235); região hsp70 5'UTR humana (nucleotídeos 1771-1973); peptídeo de sinalização de hormônio de crescimento humano (nucleotídeos 1985-2062); região variável de cadeia leve do anticorpo E3 (nucleotídeos 2063-2383); região constante de cadeia capa humana (nucleotídeos 2384-2704); sinal de poliadenilação tardio SV40 (nucleotídeos 2722-2965); região intensificadora de SV40 (nucleotídeos 2966-3211); região de fago f1 (nucleotídeos 3299-3654) e região codificante de beta lactamase (AmpR) (nucleotídeos 4191-5048). Eb.pur.911.E3 foi depositado na ATCC em 8 de janeiro de 2003, e foi atribuído o No. de Acesso ATCC PTA-4894.

Expressão celular transitória foi realizada como se segue: células CHO e HEK293T em placas de 150 mm foram co-transfectadas transitoriamente com 25 ug de cada plasmídeo (isto é, um plasmídeo contendo a cadeia pesada e um plasmídeo contendo a cadeia leve). O DNA foi misturado com 100 ul de lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os complexos de DNA-lipídeo foram deixados para entrar em contato com as células em meio DMEM/F12 sem soro ou antibióticos por 5 horas. Depois desta incubação, o meio foi trocada para expressão para Opti-MEM (Invitrogen) sem quaisquer aditivos por dois dias. Sobrenadantes celulares contendo anticorpo foram colhidos seqüencialmente até quatro vezes com reposição de meio subseqüente. Os sobrenadantes foram purificados por cromatograpia por afinidade usando resina MapSelect Protein A (Amersham biosciences 17-5199-02). O anticorpo foi ligado à resina de proteína A em 0,3 M de glicina, 0,6 M de tampão NaCl em pH 8, em seguida eluciado com 0,1 M de tampão de citrato em pH 3. Frações contendo anticorpo foram imediatamente neutralizadas com 1 M de tampão de Tris em pH 8.0,

Frações de anticorpos foram em seguida dialisadas e concentradas em PBS.

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

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

Animais. Ratos machos Sprague Dawley pesando entre 220 e 240 gramas foram adquridos da Harlan (Wisconsin) e aclimatados às instalações animais por uma semana antes da cirurgia.

Cirurgia. A cirurgia se baseou no procedimento descrito por Brennan, et al. Pain 64:493-501 (1996). Os animais foram anestesiados com um isoflurano a 2% em mistura de ar que foi mantida durante a cirurgia através de um cone nosal. A superfície plantar da pata traseira direita foi preparada com um chumaço de iodo povidona, e foi feita uma incisão longitudinal central de 1 cm através da pele e fascia, iniciando a 0,5 cm da borda do calcanhar e se estendendo em direção dos dedos dos pés. Foram feitas medições com uma régua com a pata mantida em uma posição flexionada. O músculo plantar foi elevado usando forceps curvado e incisado longitudinalmente. O músculo foi incisado através de toda a sua profundidade, entre a origem e a inserção. O sangramento foi controlado durante toda a cirurgia por pressão aplicada através de um chumaço de gaze. O ferimento foi fechado com duas suturas de colchão (monofilamento de ethilon black 5-0). Estas suturas foram amarradas 5 a 6 vezes, com o primeiro nó amarrado frouxamente. O sítio do ferimento foi esfregado com mecha com solução de bacitracina. Aos aimais foi permitido se recuperarem e repousar dentro de gaiolas limpas por duas horas ou mais antes da experimentação comportamental se iniciar.

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

O anticorpo E3 foi injetado intra peritonealmente (i.p.) em várias concentrações do anticorpo (0,004, 0,01, 0,02, 0,1, 0,6, e 1 mg por quilograma de peso animal) em 15 horas pré-incisão. O grupo controle negativo não recebeu nenhum anticorpo mas foi injetado i.p. com uma solução solução salina. Fentanila a 0,01 mg/kg foi injetado i.p. como um controle positivo 30 minutos antes da experimentação em 24 horas pós-cirurgia. Cada experimento envolveu 8 animais (n = 8 por grupo) para cada condição, e o grupo

controle teve 56 animais. A cirurgia foi realizada e um escore da dor cumulativa foi medido conforme descrito acima. A dor em repouso foi avaliada vinte e quatro horas depois da cirurgia.

Conforme mostrado na Figura 7, anticorpo anti-NGF humanizado E3 reduziu significativamente a dor em repouso ($p < 0,05$) depois de cirurgia quando administrado a 0,02 mg/kg a 1 mg/kg de dosagem. Um "*" denota uma diferença significativamente importante do controle ($p < 0,05$). Tratamento com 0,02 mg/kg aliviou o comportamento da dor de modo no mínimo tão eficaz quanto tratamento com 0,01 mg/kg de fentanila. Esta dose de fentanila é 10 vezes a dose humana normal deste potente opióide.

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

Exemplo 6: Avaliação dos efeitos analgésicos do anticorpo antagonista anti-NGF 911 em um modelo de rato de artrite reumatóide

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

Cinqüenta (50) ratos machos Lewis (LEWIS LEW / Crl Ico) (Charles River Bélgica) pesando 150 g a 220 g no início da fase experimental foram incluídos neste estudo. Todos os animais foram mantidos por no mínimo 5 dias antes do experimento, e foram alojados em um ambiente de

temperatura (19,5 a 24,5 °C), umidade relativa (45 a 65 %) e ciclo de 12 horas de luz / escuridão controlados com acesso *ad libitum* a água corrente filtrada e ração de laboratório em péletes padrão (U.A.R., França) do início ao fim do estudo. Os animais foram identificados individualmente sobre a cauda.

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

Quatro grupos de 10 ratos cada foram incluídos no estudo. Para o grupo 1 (veículo), no dia 14 (D14), depois da seleção, aos ratos foi administrado por via intravenosa veículo (solução salina). No dia 18 (D18), a intensidade nociceptiva foi avaliada por suave flexão da pata traseira e a intensidade do nível de experimentação foi registrada para cada animal. Para o grupo 2 (4 dias), no D14, depois da seleção, aos ratos foi administrado por via intravenosa 911 (10 mg/kg). No dia 18 (D18), a intensidade nociceptiva foi avaliada por suave flexão da pata traseira e a intensidade do nível de experimentação foi registrada para cada animal. Para o grupo 3 (24 horas), no dia 17 depois de injeção de CFA, aos ratos foi administrado por via intravenosa 911 (10 mg/kg). A intensidade nociceptiva foi avaliada por suave flexão da pata traseira 24 horas depois, e a intensidade do nível de experimentação foi registrada para cada animal. Para o grupo 4 (indometacina), no dia 18 (D18), a intensidade nociceptiva foi avaliada por suave flexão da pata traseira uma hora depois de administração oral de indometacina (10 mg/kg). A

intensidade do nível de experimentação também foi registrada para cada animal. As substâncias de ensaio foram administradas em uma maneira cega e aleatória por via intravenosa sob um volume de 5 ml/kg, ao passo que a indometacina foi administrada por via oral sob um volume de 10 ml/kg.

Os efeitos analgésicos do anticorpo anti-NGF 911 são mostrados na Tabela 10. Os resultados foram expressados para cada grupo à medida que a intensidade nociceptiva avaliou a intensidade do nível de vocalização registrado para cada animal em mV (média ± SEM), e a percentagem de variação da intensidade nociceptiva calculada a partir do valor médio do grupo tratado com veículo. A importância estatística entre os grupos tratados e o grupo de veículo foi determinada com um ensaio de Dunnett usando a variância residual depois de uma análise *one-way* da variância ($P< 0,05$).

Tabela 10. Efeitos analgésicos de 911 em artrite crônica induzida por adjuvante completo de freund em ratos

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

Os resultados são expressados como média ± sem

n = 10 ratos por grupo

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

Veículo: solução salina

911 (10 mg/kg) foi administrado por via intravenosa em D14 ou D17 e a medição da dor foi realizada em D18.

Indometacina (10 mg/kg) foi administrada por via oral em D18 e a medição da dor foi realizada uma hora depois da dosagem.

ensaio de Dunnett : * indica uma diferença significante em comparação com o grupo tratado com veículo para $P<0,05$

Conforme mostrado na Tabela 10, o anticorpo anti-NGF 911 reduziu significativamente a dor em um modelo de artrite reumatóide em rato 24 horas ou 4 dias depois de uma única administração do anticorpo.

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

Os efeitos farmacológicos (efeitos antiinflamatórios e analgésicos) do anticorpo antagonista anti-NGF E3 e 911 foram investigados em um modelo de artrite crônica induzida por adjuvante complete de Freund (CFA) em ratos em comparação com indometacina usada como uma substância interna de controle positivo. Os efeitos analgésicos de E3 e 911 foram avaliados pela medição da reação nociceptiva. Os efeitos antiinflamatórios foram avaliados pelo volume da pata, índice de artrite (escore de inflamação), peso corporal e das patas traseiras. Os níveis de citocinas das patas (IL-6, IL-1β, TNF-β e TGF-β1), TGF-β1 circulante no soro, concentrações plasmáticas de E3 e 911, parâmetros biológicos e radiografias de raios-X foram realizados ao final do experimento.

Protocolo experimental

1. Projeto do estudo

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

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

via oral diariamente durante 10 dias, n = 10; Grupo 4 : ratos artríticos / E3, 1 mg/kg, bólus i.v, n = 10; Grupo 5 : ratos artríticos / 911, 10 mg/kg, bólus i.v, n = 10. As doses foram expressadas em termos de substância ativa livre (mg/kg). E3 e 911 foram preparados extemporaneamente em saline a partir da solução de matéria-prima para a concentração desejada. E3 1 mg/kg: 3,41 mL da solução de matéria-prima (0,88 mg/ml) q.s.p. 15 mL de solução salina. 911 10 mg/kg: 12 mL da solução de matéria-prima (2,5 mg/ml) q.s.p. 15 mL de solução salina. Todas as soluções diluídas (antes de injeção i.v) foram esterilizados usando uma unidade de filtro estérila de 0,20 µm. Os valores do pH e da osmolaridade de soluções diluídas foram medidos antes de cada injeção i.v.. Antes da primeira i.v., a osmolaridade (mosm/L) para solução salina, E3, e 911 foram 278, 269, e 308 respectivamente; pH para solução salina, E3, e 911 foram 5,93, 6,76, 6,71 respectivamente. Antes da segunda i.v., a osmolaridade (mosm/L) para solução salina, E3, e 911 foram 280, 270, e 309 respectivamente; pH para solução salina, E3, e 911 foram 5,86, 6,72, e 6,59 respectivamente.

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

2. Indução de artrite

No Dia 0 (D 0), foi induzida artrite em 70 ratos por injeção intradérmica na cauda de 0,05 ml de uma suspensão de *Mycobacterium butyricum*. Um grupo de 10 ratos não recebeu qualquer injeção intradérmica (ratos não artríticos). No Dia 14 (D 14), os ratos artríticos foram incluídos no estudo usando os seguintes critérios: todos os ratos incluídos apresentaram um aumento no volume médio da pata (média do volume das patas esquerda e direita) de no mínimo 0,30 ml comparado com o (média do volume das patas

esquerda e direita) no grupo não-artrítico (medição do volume da pata conforme descrito abaixo); todos os ratos incluídos apresentaram uma vocalização na flexão suave (medição da reação nociceptiva conforme descrito abaixo); e todos os ratos incluídos apresentaram um escore do índice de artrite de 2 a 3 sobre cada pata traseira (medição do índice de artrite conforme descrito abaixo) (os animais com um escore de 0, 1 ou 4 foram descartados).

3. Peso corporal

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

3. Medição do volume da pata

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

4. Índice de artrite

O índice de artrite foi avaliado usando um escore de inflamação para cada pata traseira e pata dianteira (ratos artríticos): Escore 0: aspecto normal; Escore 1: eritema; Escore 2: eritema com ligeiro edema; Escore 3: forte inflamação sem anquilose; Escore 4: anquilose. Esta avaliação foi realizada nos seguintes momentos (depois da indução de artrite): Dia 14 (antes de bólus i.v. ou administração por via oral); e Dia 24 (5 dias depois da última injeção de bólus i.v. ou 24 h depois da última administração por via oral). Todas as medições foram realizadas entre 2:00 e 3:00 horas da tarde (D 14), 8:00 e 9:00 horas da manhã (D 24). Todos os dados foram coletados e armazenados pelo software WinDas.

5. Medição da reação nociceptiva (Ensaio de vocalização)

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

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

No Dia 24 (depois das medições do volume das patas e o índice de artrite e experimentação de ensaio), sob anaestesia geral usando isoflurano (em uma mistura de oxigênio e óxido nitroso), as amostras de sangue (cerca de 800 a 1000 µl) foram coletadas por ação capilar com uma micropipeta a partir do seio retroorbital.

Medição da *concentração de* E3 ou 911 *(*grupos 2, 4 e 5): Uma parte da amostra de sangue foi coletada em tubos contendo Li-Heparina (mantida sobre gelo) e centrifugados a 2500-3000 g por 10 min. Amostras de plasma (no mínimo 100 µL) foram obtidas, congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas a -80°C. Uma amostra foi ligeiramente hemolisada (rato artrítico tratado com veículo no. 36).

Medição de TGF-β1 *c*irculante (grupos 1-2-3-4-5): Uma parte da amostra de sangue foi coletada em micro tubos para preparação de soro em temperatura ambiente. Depois de coleta da amostra, foi misturado sangue e deixado para coagular por 30 minutos antes da centrifugação. Os tubos foram centrifugados a cerca de 6000 g por 3 minutos. Cada amostra de soro (no mínimo 100 µL, exceto pelo rato no. 52 e no. 53) foi dividida em alíquo-

tas e armazenadas a -20°C até análise da ativação da amostra por TGF-β1. Estas alíquotas (50 frascos) foram mantidas por um período de 6 meses iniciando a partir do fim do estudo. Algumas amostras foram hemolisadas ligeiramente (rato não artrítico tratado com veículo: no. 2, no. 5, no. 9, no. 10; rato artrítico tratado com veículo: no. 53, no. 63; rato artrítico tratado com E3 no. 31, no. 51; rato artrítico tratado com 911: no. 52, no. 62, no. 64). Os níveis de TGF-β1 foram medidos usando kit ELISA de TGF-β1 humano (ref. DB100, Lote 212258 e 213610, R&D Systems - França).

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

7. Níveis de citocinas das patas

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

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

mazenados a -80°C até o uso.

Medição dos níveis de citocina: Os níveis de citocina de TNF-α (kit ELISA de TNF-α de rato, ref. RTA00, Lote 213718, R&D Systems, França) , IL-1β de rato (kit ELISA IL-1β , ref. RLB00, batelada 212435, R&D Systems, França), IL-6 de rato (kit ELISA IL-6 , ref. R6000, Lote 211773, 214008 e 214362, R&D Systems, França), e TGF-β1 Humano (kit ELISA TGF-β1, ref. DB100, batelada 212258 e 213610, R&D Systems, França) foram determinados em duplicata, de acordo com o procedimento do fabricante. Alíquotas de homogenados das patas traseiras foram armazenadas a -80°C.

8. Análise por raios-X

No Dia 24, depois da coleta de sangue os animais foram sacrificados e foram obtidas radiografias de raios X (patas traseira) para avaliação de lesões das juntas. A análise de raios-X foi focalizada sobre erosões articulares, o espaço articular, anormalidades do periósteo sobre ambas as patas traseira. Todas as radiografias foram analisadas olhando sete itens diferentes: a lesão de tecidos moles, deformidade, desmineralização, o espaço articular, erosões, osteogênese e reação periostal. Para cada animal, os seis primeiros itens foram analisados de modo independente olhando a pior pata traseira. A reação periostal foi analisada olhando a cauda. Para cada item, o escore vai de 0 (normal) a 4 (lesão máxima). Portanto o escore total vai de 0 a 28. A interpretação radiográfica foi feita pelo mesmo leitor sem saber nada sobre os animais (tratados ou não tratados).

9. Observações

Um animal (no. 65) morreu em D 23 depois da administração de indometacina (antes da administração em D 23) devido a uma causa desconhecida.

10. Análise e expressão de resultados

Todos os resultados foram reportados como Média ± S.E.M. de 10 ratos em cada grupo em cada ponto de tempo. O volume das patas foi expressado em ml calculados a partir do valor médio do volume das patas direita e esquerda. O índice de artrite foi calculado a partir da soma do escore obtido para cada uma das 4 patas. A reação nociceptiva foi avaliada pela

intensidade do nível de vocalização registrado para cada animal (méda de 4 valores: 2 tempos / pata) em mV. A percentagem de inibição da reação nociceptiva foi calculada a partir do valor médio do grupo artrítico tratado com veículo [(valor médio do grupo artrítico tratado com veículo - valor médio do grupo artrítico tratado / valor médio do grupo artrítico tratado com veículo)*100]. O peso corporal foi expressado em gramas. O peso das patas traseira (esquerda e direita) foi expressado em gramas. Os níveis de citocina (IL-6, IL-1□, TNF-□ e TGF-□1) de cada pata traseira foram expressados em pg/ml. Os níveis circulantes de TGF-□1 foram expressados em pg/ml. O índice radiológico para cada parâmetro (desmineralização, erosões, reação periostal, lesão de tecidos moles, espaço articular, deformidade por osteogênese) e o índice radiológico total (escore total) foram calculados a partir da soma dos escores obtidos para cada parâmetro. As significâncias inter-grupo dos desvios entre os valores do grupo tratado com veículo (ratos artríticos) e o grupo tratado com veículo (ratos não artríticos) foram avaliadas pelo ensaio *t* de Student ou Mann-Whitney Rank Sum Test quando igual variância ou ensaio de normalidade falhou. significâncias inter-grupo dos desvios entre os valores do grupo tratado com veículo (ratos artríticos) e grupos tratados com E3 e tratados com 911 e tratados com Indometacina foram avaliadas pela análise *1-way* de variância ANOVA seguida pelo ensaio *t* de Dunnett não pareado. Uma probabilidade de $P \leq 0,05$ foi considerada como significante. Toda a análise estatística foi realizada pelo software Sigmastat™.

Resultados

1. Reação nociceptiva (ensaio de vocalização)

Conforme mostrado na Tabela 11 e na Figura 18, em D 14, a reação nociceptiva foi 4147 ± 331, 4386 ± 235, 4644 ± 367 e 4468 ± 143 em grupos artríticos tratados com veículo, tratados com indometacina, tratados com E3 , e tratados com 911, respectivamente. Indometacina reduziu fortemente e significativamente a reação nociceptiva depois de 3 mg/kg/dia por via oral (por 10 dias) por cerca de -3768 mV (% de inibição: 71 %) e -4353 mV (% de inibição: 74 %) em D 18 e D 24, respectivamente comparados com o grupo artrítico tratado com veículo (D 18: 1511 ± 398 vs 5279 ± 326

mV; D 24: 1552 ± 508 vs 5905 ± 345 mV). E3 (1 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) reduziu fortemente e significativamente a reação nociceptiva por cerca de -4167 mV (% de inibição : 79 %) e -5905 mV (% de inibição: 100 %) em D 18 e D 24, respectivamente comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (D 18: 1112 ± 401 vs 5279 ± 326 mV; D 24: 0 ± 0 vs 5905 ± 345 mV). 911 (10 mg/kg i.v. 2 dias em D 14 e D 19) reduziu fortemente e significativamente a reação nociceptiva por cerca de -3932 (% de inibição: 74 %) e -5358 mV (% de inibição: 91 %) em D 18 e D 24, respectivamente comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (D 18: 1347 ± 492 vs 5279 ± 326 mV; D 24: 547 ± 307 vs 5905 ± 345 mV).

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

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

Os valores são expressados em mV como Média ± S.E.M.

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

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

2. Peso corporal

Conforme mostrado na Tabela 12 e na Figura 19, foi observada uma acentuada redução no ganho de peso corporal em ratos artríticos em comparação com ratos não artríticos de D 0 a D 14 devido a estabelecimento de artrite. Em D 14 (dia da seleção) os ratos artríticos apresentaram uma significativa redução no peso comparados com os ratos não artríticos (289 ± 2 *vs* 217 ± 4 g) (ensaio *t* de Student $P<0,05$). No entanto, não foi detectada diferença significativa no peso (D 14) em todos os grupos artrítico (ensaio *t* de Dunnett $P> 0,05$). O peso corporal aumentou moderadamente e significativamente no grupo tratado com Indometacina (3 mg/kg/dia por 10 dias) de D 17 a D 24 com um máximo de cerca de 43 g em D 24 comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (261 ± 5 *vs* 218 ± 3 g). Depois de tratamento com E3 (1 mg/kg i.v. em D 14 e D 19), o peso corporal aumentou moderadamente e significativamente de D 17 a D 24 com um máximo de cerca de 46 g em D 24 comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (264 ± 5 g *vs* 218 ± 3 g). Depois de tratamento com 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19), o peso corporal aumentou moderadamente e significativamente de D 18 a D 24 com um máximo de cerca de 47 g em D 24 comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (265 ± 7 *vs* 218 ± 3 g).

Tabela 12. Efeitos de E3 e 911 depois de injeção i.v. (2 dias: D 14- D 19) sobre o peso corporal em artrite reumatóide em ratos

	Dia	D0	D3	D4	D5	D6	D7	D11	D12	D13	D14
Ratos Não Artríticos	veículo i.v.	197 ±2	215 ±2	222 ±2	232 ±2	236 ±2	244 ±2	272 ±2	277 ±2	282 ±2	289 ±2
Ratos Artríticos	veículo i.v.	199 ±2	214 ±2	221 ±2	230 ±2	236 ±2	241 ±3	229 ±6	223 ±5	218 ±5	217 ±4
	E3 1 mg/kg i.v.	206 ±4	222 ±3	230 ±3	241 ±3	243 ±3	249 ±3	242 ±6	237 ±6	230 ±5	225 ±5
	911 10 mg/kg i.v.	201 ±2	211 ±5	218 ±5	227 ±5	231 ±5	239 ±5	234 ±8	228 ±7	221 ±7	218 ±6
	Indometacina 3 mg/kg por via oral *durante 10 dias*	202 ±3	217 ±4	225 ±4	235 ±4	239 ±4	246 ±4	242 ±7	235 ±7	227 ±6	224 ±5

Continuação

	Dia	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24
Ratos Não Artríticos	veículo i.v.	285 ±2	291 ±2	297 ±2	302 ±3	307 ±3	308 ±3	312 ±3	316 ±3	321 ±3	326 ±3
Ratos Artríticos	veículo i.v.	213 ±4	212 ±4	211 ±3	210 ±3	208 ±3	210 ±3	212 ±3	214 ±3	216 ±3	218 ±3
	E3 1 mg/kg i.v.	223 ±5	224 ±5	227 ±4 *	232 ±4 *	235 ±4 *	238 ±4 *	245 ±4 *	250 ±5 *	257 ±5 *	264 ±5 *
	911 10 mg/kg i.v.	217 ±5	221 ±5	226 ±5	229 ±5 *	233 ±6 *	239 ±6 *	246 ±6 *	253 ±6 *	258 ±6 *	265 ±7 *
	Indometacina 3 mg/kg por via oral *durante 10 dias*	230 ±4	230 ±5	231 ±4 *	234 ±4 *	236 ±4 *	241 ±4 *	246 ±4 *	248 ±5 *	253 ±5 *	261 ±5 *

Os valores são expressados em gramas como Média ± S.E.M.

n = 10 animais por grupo exceto em D 23 e D 24 (n = 9) para Indometacina

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

3. Volume das patas

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

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

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

Dia		D14	D24
	3 mg/kg por via oral	±0,06	±0,03
	durante 10 dias		*

Os valores são expressados em mL como Média ± S.E.M.

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

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

4. Índice de artrite

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

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

Dia		D14	D24
	veículo i.v.	10,1 ±0,8	10,7 ±0,6
	E3 1 mg/kg i.v.	10,2 ±0,4	11,4 ±0,4
Ratos Artríticos	911 10 mg/kg i.v.	9,4 ±0,7	10,9 ±0,7

Dia	D14	D24
Indometacina 3 mg/kg por via oral *durante 10 dias*	8,7 ±0,6	2,7 ±0,7 *

Os valores são expressados como Média ± S.E.M. (escore)

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

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

5. Níveis de citocina das patas

Conforme mostrado na Tabela 15, em D 24, os níveis de citocina nas patas esquerda e direita estavam aumentados no grupo artrítico tratado com veículo por um máximo de cerca de 3,5 (IL-1□), 4 (TNF-□) e 1,8 (TGF-□1) vezes comparado com o grupo não artrítico tratado com veículo. Não foi observada diferença significativa para os níveis de IL-6, na pata direita e esquerda, entre os dois grupos. Os níveis de citocina do grupo artrítico foram similares na pata esquerda e direita: 259,7 ± 38,5 *vs* 219,2 ± 32,4, 4802,8 ± 365,5 *vs* 4007,1 ± 380,4, 17,8 ± 1,6 *vs* 18,6 ± 1,9 e 9735,0 ± 1219,8 *vs* 9161,4 ± 846,1 pg/ml para IL-6, IL-1β, TNF-α e TGF-β1 respectivamente. Indometacina reduziu ligeiramente, mas significativamente, o nível de TGF-β1 na pata direita depois de 3 mg/kg/dia por via oral (por 10 dias) por cerca de 1,3 vezes, comparada com o grupo artrítico tratado com veículo (7057,4 ± 335,6 vs 9161,4 ± 846,1), ao passo que não modificou os níveis de IL-6, TNF-α ou IL-1β. Foi observado um efeito similar mas não significativo na pata esquerda. E3 (1 mg/kg i.v. no D 14 e D 19) não afetou os níveis de IL-6, IL-1β, TNF-α ou TGF-β1, em ambas as patas, comparado com o grupo artrítico tratado com veículo. 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) aumentou o nível de IL-1β na pata direita comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (6215,3 ± 666,7 vs 4007,1 ± 380,4). Não teve nenhum efeito sobre outros níveis de citocina em ambas as patas.

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

Níveis de citocina das patas esquerdas

Ratos não artríticos		Ratos artríticos			
veículo i.v.		veículo i.v.	E3 1 mg/kg i.v.	911 10 mg/kg i.v.	Indometacina 3 mg/kg por via oral
IL-6	298,6 ±35,6	259,7 ±38,5	234,4 ±35,2	262,5 ±42,5	249,7 ±60,4
IL-1β	1383,0 ±57,9	4802,8 ±365,5	5060,0 ±473,5	5500,8 ±625,3	4029,1 ±449,9
TNF-α	4,3 ±2,9	17,8 ±1,6	23,6 ±2,5	29,9 ±4,8	29,9 ±3,6
TGF-β1	5264,7 ±209,2	9735,0 ±1219,8	9796,7 ±491,2	11053,5 ±713,3	7708,2 ±293,9

Níveis de citocina das patas direitas

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

Os valores são expressados em pg/ml, como Média ± S.E.M.

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

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

6. Medição de TGF-β1 circulante

Conforme mostrado na Tabela 16, em D 24, o nível sérico de TGF-β1 estava aumentado no grupo artrítico tratado com veículo comparado com o grupo não artrítico tratado com veículo (81715,7 ± 1984,1 *vs* 60269,9 ± 2142,8). Indometacina reduziu significativamente o nível sérico de TGF-□ı depois de 3 mg/kg/dia por via oral (por 10 dias) por cerca de 1,5 vezes, comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (57222,2 ± 3194,1 vs 81715,7 ± 1984,1). E3 (1 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) e 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) reduziu significativamente o nível sérico de TGF-β1 de modo que o nível de citocina nos grupos tratado com E3 e tratado com 911 foram comparáveis com os observados no grupo não artrítico tratado com veículo (69408,8 ± 3926,7 e 67214,5 ± 3649,4 respectivamente, vs 60269,9 ± 2142,8).

Tabela 16. Efeito de E3 e 911 depois de injeção i.v. (2 dias em D 14 e D 19) sobre os níveis séricos de TGF-β1 em ratos artríticos reumatóides

Ratos não artríticos		Ratos artríticos			
veículo i.v.		veículo i.v.	E3 1 mg/kg i.v.	911 10 mg/kg i.v.	Indometacina 3 mg/kg por via oral
TGF-β1	60269,9 ±2142,8	81715,7 ±1984,1	69408,8 ±3926,7 *	67214,5 ±3649,4 *	57222,2 ±3194,1 *

Os valores são expressados em pg/ml, como Média ± S.E.M.

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

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

veículo

7. Parâmetros hematológicos

Conforme mostrado na Tabela 17, os parâmetros hematológicos tais como hemácias e plaquetas foram maiores em ratos artríticos tratados com veículo em comparação com ratos não artríticos tratados com veículo (ensaio t de Student $P<0,05$), ao passo que as hemácias, hemoglobina e hematócrito (ensaio t de Student $P>0,05$) foram inalterados. Indometacina não afetou os parâmetros sangüíneos depois de 3 mg/kg/dia por via oral (por 10 dias) comparado com o grupo artrítico tratado com veículo. E3 (1 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) não afetou os parâmetros sangüíneos comparado com o grupo artrítico tratado com veículo. 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) não afetou os parâmetros sangüíneos comparado com o grupo artrítico tratado com veículo.

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

	Dia	Leucócitos $10^3/mm^3$	Hemácias $10^6/mm^3$	Hemoglobina g/dl	Hematócrito %	Plaquetas $10^3/mm^3$
Ratos Não Artríticos	veículo i.v.	8,7 ±0,9 n = 9	7,98 ±0,31 n = 9	15,1 ±0,7 n = 9	42,6 ±1,6 n = 9	322 ±89 n = 9
Ratos Artríticos	veículo i.v.	19,0 ±0,9 n = 10	7,54 ±0,31 n = 10	13,2 ±0,7 n = 10	37,4 ±1,6 n = 10	10,43 ±89 n = 10
	E3 1 mg/kg i.v.	19,1 ±1,2 n = 7	7,74 ±0,17 n = 8	12,9 ±0,3 n = 8	38,5 ±1,0 n = 8	827 ±77 n = 8
	911 10 mg/kg i.v.	22,6 ±2,9 n = 8	7,30 ±0,40 n = 9	12,1 ±0,7 n = 9	36,5 ±2,1 n = 9	799 ±121 n = 9

Dia	Leucócitos $10^3/mm^3$	Hemácias $10^6/mm^3$	Hemoglobina g/dl	Hematócrito %	Plaquetas $10^3/mm^3$
Indometacina 3 mg/kg por via oral *durante 10 dias*	21,7 ±2,5 n = 9	6,93 ±0,31 n = 9	11,8 ±0,6 n = 9	35,0 ±1,5 n = 9	705 ±111 n = 9

Os valores são expressados como Média ± S.E.M.

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

7. Peso da pata traseira

Conforme mostrado na Tabela 18, o peso da pata traseira esquerda e direita foi maior nos ratos artríticos tratados com veículo do que nos ratos não artríticos tratados com veículo (3,43 ± 0,11 *vs* 1,98 ± 0,01 e 3,32 ± 0,12 *vs* 1,99 ± 0,02 g, respectivamente) (ensaio *t* de Student ou Mann-Withney P<0,05). Indometacina reduziu significativamente o peso das patas traseiras depois de 3 mg/kg/dia por via oral (por 10 dias) comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (pata traseira esquerda : 2,23 ± 0,04 *vs* 3,43 ± 0,11 g; pata traseira direita: 2,20 ± 0,05 *vs* 3,32 ± 0,12 g). E3 (1 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) somente aumentou significativamente o peso da pata traseira esquerda comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (pata traseira esquerda : 3,86 ± 0,14 *vs* 3,43 ± 0,11 g; pata traseira direita: 3,72 ± 0,13 *vs* 3,32 ± 0,12 g). 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) somente aumentou significativamente o peso da pata traseira direita comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (pata traseira esquerda : 3,73 ± 0,12 *vs* 3,43 ± 0,11 g; pata traseira direita: 3,83 ± 0,15 *vs* 3,32 ± 0,12 g).

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

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

Os valores são expressados em gramas como Média ± S.E.M.

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

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

8. Análise por raios-X

Conforme mostrado na Tabela 19, foi observado um escore total de 0,0 ± 0,0 nos ratos não-artríticos tratados com veículo. Os ratos artríticos tratados com veículo têm um escore total de 15,1 ± 1,3 com altos escores para desmineralização (2,4 ± 0,3), erosões (2,7 ± 0,3), lesão de tecidos moles (3,1 ± 0,2) e espaço articular (3,3 ± 0,2), um escore moderado para reação periostal (1,0 ± 0,3), osteogênese (0,8 ± 0,2) e deformidade (1,8 ± 0,2).

Indometacina (3 mg/kg/dia por via oral por 10 dias) reduziu fortemente e significativamente o escore total por cerca de 10,7 em comparação com ratos artríticos tratados com veículo (4,4 ± 0,9 vs 15,1 ± 1,3). E3 (1 mg/kg i.v. no D 14 e D 19) não afetou o escore total comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (14,2 ± 1,3 vs 15,1 ± 1,3). 911 (10 mg/kg i.v. em D 14 e D 19) não afetou o escore total comparado com o grupo artrítico tratado com veículo (15,4 ± 10 vs 15,1 ± 1,3).

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

Dia		Desminer-alização	Erosões	Reação Periostal	Lesão de tecidos moles	Espaço articular	osteo-gênese	Deformi-dade	Escore TOTAL
Ratos	**veiculo i.v.**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
Não Artríticos		±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0
	veiculo i.v.	**2,4**	**2,7**	**1,0**	**3,1**	**3,3**	**0,8**	**1,8**	**15,1**
		±0,3	±0,3	±0,3	±0,2	±0,2	±0,2	±0,2	±1,3
	E3 1 mg/kg i.v.	**2,0** ±0,2	**2,4** ±0,3	**0,8** ±0,2	**3,3** ±0,3	**2,7** ±0,2	**1,2** ±0,2	**1,8** ±0,2	**14,2** ±1,3

Continuação

Dia		Desminer-alização	Erosões	Reação Periostal	Lesão de tecidos moles	Espaço articular	osteo-gênese	Deformi-dade	Escore TOTAL
Ratos Artríticos	**911 10 mg/kg i.v.**	**2,3** ±0,3	**2,5** ±0,2	**1,0** ±0,3	**3,4** ±0,2	**3,3** ±0,2	**0,9** ±0,2	**2,0** ±0,2	**15,4** ±1,0
	Indome-tacina 3 mg/kg por via oral	**0,3** ±0,2 *	**0,9** ±0,2 *	**0,7** ±0,3	**1,0** ±0,2 *	**1,0** ±0,2 *	**0,1** ±0,1	**0,4** ±0,2 *	**4,4** ±0,9 *

Os valores são expressados como Média ± S.E.M (escore).

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

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

Conclusão

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

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

A capacidade de E3 para produzir redução na dor em ratos artríticos foi adicionalmente investigada examinando a relação da reação da dose entre administração de E3 e redução da dor. Os ratos foram tratados com adjuvante para induzir artrite conforme descrito acima. Dez ratos não-injetados com adjuvante foram usados como controles não-artríticos. Quatorze dias depois da injeção de adjuvante, os animais foram qualificados no estudo com base nos critérios determinados acima, randomizados em oito grupos de dez ratos e testados para a intensidade de sua reação de vocalização. Em seguida eles foram dosados dia 14 com solução salina, ou 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg ou 5 mg/kg de anticorpo E3 conforme descrito acima. Os animais foram testados para sua reação de vocalização nos dias 16, 18, 20, e 24. Os animais foram redosados com solução salina ou a mesma dose de E3 no dia 18 depois do experimento de vocalização. Os animais foram também pesados a cada dia, iniciando no dia 14. Portanto, os animais foram dosados duas vezes com uma dada dose do anticorpo ou solução salina nos dias 14 e 18, e avaliados para dor cinco vezes, nos dias 14, 16, 18, 20 e 24. Os são mostrados nas Tabelas 20 a 22 e nas Figuras 20 a 22.

Tabela 20. Efeitos de diferentes doses de E3 sobre reação nociceptiva (intensidade da vocalização) em ratos artríticos reumatóides. Os valores da intensidade da vocalização são expressados em mV como média ± s.e.m.

		Veiculo	0.003mg/kg	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg	1.0 mg/kg	5.0 mg/kg
Dia 14	média	1129.25	981.75	1007.28	963.18	1159.30	1191.58	1067.00	896.25
	s.e.m	143.06	71.00	66.50	62.12	132.76	123.44	69.73	57.53
Dia 16	média	1042.85	825.60	576.88	448.43	283.71	151.85	98.62	79.18
	s.e.m	130.51	57.94	49.71	81.01	60.00	26.08	29.17	27.30
Dia 18	média	968.10	427.43	334.45	292.52	262.96	194.19	174.13	200.42
	s.e.m	117.85	48.55	35.10	52.36	62.32	53.56	88.61	120.15
Dia 20	média	942.18	448.00	313.13	209.48	79.74	66.27	71.23	63.57
	s.e.m	100.69	33.73	61.98	24.43	33.18	31.34	42.37	23.47
Dia 24	média	913.68	724.50	596.38	513.60	432.45	176.32	19.21	12.35
	s.e.m	131.29	115.90	44.76	63.67	70.38	66.61	10.14	12.35

O efeito de tratar animais com várias doses de anticorpo anti-NGF E3 sobre a vocalização induzida por dor (dados mostrados na Tabela 20) foi analisado estatisticamente usando "two-way" (ANOVA) para comparar os resultados obtidos pareados entre animais artríticos tratados com veículo com aqueles tratados com uma dada dose do anticorpo E3. Houve um efeito altamente significativo em todos os níveis de E3 testados ($p < 0,0001$). Mesmo na menor dose testada (0,003 mg/kg de E3), a diferença na vocalização foi significativa ($p < 0,0001$).

Conforme mostrado na Tabela 20 e na Figura 20, de acordo com os experimentos acima, o tratamento com anticorpo E3 a 1 mg/kg mostrou um alívio rápido e forte da dor. Dentro de dois dias (o ponto de tempo mais cedo testado) a intensidade da vocalização baixou por 90%. Tratamento com menores concentrações de E3 também proporcionou forte alívio da dor, embora em menores doses o alívio da dor levou um pouco mais de tempo para se manifestar. É provável que a redução aparente na eficácia no dia 24 de todas exceto as maiores doses testadas seja devida a uma redução no nível real do nível plasmático de E3 secundário a uma reação imune pelos ratos objetos de experiência. É evidente que doses tão baixas quanto 0,003 mg/kg proporcionam no mínimo alívio parcial da dor neste modelo.

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

	Não-artrítico		Veículo		0.003 mg/kg		0.01 mg/kg		0.03 mg/kg	
Dia	Média	S.E.M	Média	S.E.M	Média	S.E.M	Média	S.E.M	Média	S.E.M
14	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
15	99.53	0.30	99.14	0.37	99.20	0.48	99.18	0.43	100.34	0.36
16	102.52	0.45	99.57	0.60	99.58	0.79	99.33	0.72	100.89	0.57
17	103.31	0.41	99.50	0.64	100.46	0.77	99.69	0.73	101.80	0.82
18	106.11	0.72	100.26	0.93	100.90	1.19	100.69	0.72	102.70	0.92
20	109.62	0.85	101.46	1.22	102.26	1.56	102.70	1.07	104.51	0.75
21	110.52	0.93	102.73	1.49	103.16	1.87	102.63	1.18	105.08	0.98
23	114.28	1.19	104.54	1.92	106.09	1.67	104.41	1.33	106.14	1.06
24	115.44	1.15	105.12	1.92	106.16	1.90	104.23	1.46	106.23	1.26

	0.1 mg/kg		0.3 mg/kg		1.0 mg/kg		5.0 mg/kg	
Dia	Média	S.E.M	Média	S.E.M	Média	S.E.M	Média	S.E.M
14	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
15	99.83	0.59	101.05	0.38	100.53	0.37	101.61	0.41
16	101.07	0.82	102.88	0.50	102.95	0.56	104.09	0.60
17	101.89	1.12	104.76	0.70	105.74	0.76	106.85	0.79
18	103.69	1.47	107.11	0.78	108.46	0.82	109.53	1.00
20	107.36	1.78	111.26	0.77	113.57	0.83	115.32	1.11
21	108.50	2.01	113.31	0.87	116.71	0.92	119.11	1.21
23	109.25	2.15	115.59	1.38	123.35	1.13	126.36	1.94
24	108.77	2.08	115.58	1.43	124.41	1.00	127.25	1.79

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

	Não-artrítico		vehicle		0.003 mg/kg		0.01 mg/kg		0.03 mg/kg	
Dia	Média	*S.E.M*	Média	*S.E.M*	Média	*S.E.M*	Média	*S.E.M*	Média	*S.E.M*
0	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
1	100.45	0.19	98.34	0.48	98.37	0.35	98.86	0.33	98.67	0.34
2	105.94	0.33	101.75	0.71	102.47	0.59	102.61	0.40	102.05	0.53
3	109.29	0.33	105.04	1.04	106.54	0.99	106.29	0.60	105.31	0.85
4	113.13	0.46	109.14	1.15	110.09	0.72	110.61	0.41	109.24	0.82
7	124.15	0.70	119.90	1.39	121.29	1.32	121.59	0.72	117.15	1.36
8	127.82	0.80	123.38	1.52	124.44	1.43	124.47	1.24	118.52	1.89
9	132.40	0.80	125.50	1.59	125.91	1.69	125.82	1.95	118.60	2.62
10	135.91	0.83	123.51	1.77	123.30	2.47	123.87	2.59	115.26	3.19
11	140.42	1.13	119.82	1.98	119.55	2.76	121.20	2.99	112.94	3.48
14	152.59	1.72	111.79	1.40	111.50	1.87	111.80	1.65	108.37	2.75
15	151.87	1.87	110.82	1.41	110.63	2.05	110.85	1.44	108.68	2.45
16	156.47	2.25	111.33	1.74	111.08	2.32	110.98	1.31	109.21	2.16
17	157.65	2.08	111.24	1.62	112.06	2.36	111.42	1.66	110.16	2.03
18	161.98	2.71	112.16	2.21	112.60	2.78	112.54	1.64	111.14	2.11
20	167.36	2.93	113.49	2.37	114.17	3.24	114.82	2.12	113.17	2.49
21	168.73	3.07	114.93	2.62	115.25	3.68	114.76	2.30	113.80	2.68
23	*174.51*	*3.54*	*116.96*	*3.02*	*118.48*	*3.49*	*116.76*	*2.51*	114.93	2.62
24	176.27	3.50	117.63	3.13	118.58	3.71	116.56	2.57	114.99	2.51

	0.1 mg/kg		0.3 mg/kg		1.0 mg/kg		5.0 mg/kg	
Dia	Média	S.E.M	Média	S.E.M	Média	S.E.M	Média	S.E.M
0	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
1	99.31	0.61	99.26	0.28	98.81	0.27	98.25	0.58
2	102.87	0.73	102.98	0.43	103.18	0.50	101.82	0.53
3	106.26	0.82	106.95	0.50	106.52	0.55	105.47	0.58
4	110.20	0.64	110.50	0.58	110.52	0.67	109.29	0.58
7	120.50	1.20	120.03	0.82	121.54	1.15	119.77	1.19
8	123.48	1.58	121.38	1.31	124.28	1.59	121.96	1.72
9	125.46	2.47	121.57	2.09	125.60	2.23	123.04	2.42
10	123.95	3.38	118.27	3.07	124.11	2.97	120.00	2.81
11	121.98	3.93	116.02	3.32	121.27	3.42	117.97	2.98
14	113.90	2.14	108.43	1.94	111.72	2.27	111.58	2.59
15	113.66	1.91	109.59	2.12	112.30	2.23	113.33	2.37
16	*115.06*	*2.00*	*111.54*	*2.02*	*115.00*	*2.36*	*116.06*	*2.30*
17	115.99	2.18	113.57	2.04	118.08	2.32	119.14	2.42
18	118.01	2.29	116.13	2.14	121.16	2.55	122.14	2.61
20	122.17	2.57	120.62	2.20	126.90	2.87	128.60	2.77
21	123.49	2.90	122.88	2.49	130.41	2.98	132.82	2.84
23	124.35	3.02	125.36	2.83	137.81	3.09	140.79	2.83
24	123.77	2.80	125.33	2.75	138.93	2.76	141.77	2.61

O efeito de tratar animais com várias doses de anticorpo anti-NGF E3 sobre o peso corporal foi analisado estatisticamente usando ANOVA two-way para comparar os resultados obtidos pareados entre animais artríticos tratados com veículo com aqueles tratados com uma dada dose do anticorpo E3. Usando dados normalizados para o peso no dia 14 (Tabela 21), doses de 0,03 mg/kg de E3 resultaram em uma alteração significativa no peso corporal ($p<0.005$). Em toda a dose maior de E3, a diferença entre animais artríticos tratados e não tratados foi significativa ($p =$ ou $< 0,0001$). Usando dados normalizados para o peso no dia 0 (Tabela 22), dose de 0,03 mg/kg de E3 resultou em uma alteração significativa no peso corporal ($p<0.002$). Em toda a dose maior de E3, a diferença entre animais artríticos tratados e não tratados foi significativa ($p < 0,0001$).

Novamente de acordo com estudos anteriores, ratos tratados com E3 apresentaram menos perda de peso aparente do que ratos artríticos tratados com solução salina (Tabela 22 e Figura 22). De fato, ratos tratados com altas doses do anticorpo E3 foram recuperando a perda de peso anterior, e na verdade ganhando peso mais rápido do que suas coortes não artríticas (Tabela 21 e Figura 21).

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

Neste estudo de escalonamento da dose, randomizado, controlado por placebo, duplo-cego, efeitos analgésicos de doses intravenosas

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

Trinta e quatro pacientes foram admitidos no estudo e avaliados como pacientes internados para os Dias de Estudo -1, 1 e 2. A administração de anticorpos anti-NGF E3 ocorreu na manhã do Dia 1. Foram usados diários eletrônicos para registrar o índice de dor do joelho e uso de medicação de auxílio na clínica e em casa. Dez pacientes foram tratados com placebo. Vinte e quatro pacientes foram tratados com anticorpo anti-NGF E3: quatro pacientes por nível de dose para 3 µg/kg (coorte 1), 10 µg/kg (coorte 2), e 30 µg/kg (coorte 3); e seis pacientes por nível de dose para 100 µg/kg (coorte 4) e 300 µg/kg (coorte 5). O placebo usado foi Injeção de Cloreto de Sódio a 0,9% estéril, USP (solução salina normal). Anticorpo anti-NGF E3 foi uma formulação líquida congelada consistindo em 10 mg/ml de anticorpo em uma solução aquosa de 10 mM de histidina, 275 mM de sacarose, 0,01% de polissorbato 20, pH 6.0. Uma hora antes da administração IV, anticorpo congelado foi degelado e diluído em Injeção de Cloreto de Sódio, USP. O volume para cada paciente foi calculado com base no peso do paciente Dia -1 e nível de dose atribuída, variando de 3-6 cc para a coorte 1, 10-20 cc para a coorte 2, 30-60 cc para a coorte 3, e 100 cc para a coorte 4 e a coorte 5. Para as coortes 1 e 2, o anticorpo E3 foi administrado por um bólus IV lento

durante 3 a 5 minutos, seguido por um jato IV de 5 cc de Injeção de Cloreto de Sódio, USP. Para as coortes 3-5, anticorpo E3 foi administrado a 100 cc/hour através de bomba de infusão, seguido por um jato IV de 5 cc de Injeção de Cloreto de Sódio, USP e descontinuação do IV. Dentro de cada coorte, o placebo (Injeção de Cloreto de Sódio, USP) foi administrado por bólus lento ou infusão contínua do mesmo modo que o anticorpo E3.

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

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

Foi emitido diário eletrônico para coleta de dados no dia -8 e foi feita uma avaliação de triagem de 7 dias da aceitação do diário eletrônico do dia -8 ao dia -2 para determinar o sucesso no uso dos diários eletrônicos para um dado sujeito. Os indivíduos foram instruídos a completar 4 diários por dia. O VAS médio registrado durante o período de triagem é usado como linha de base para avaliação da eficácia.

Também foi usada a WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Scale) 3.1 Osteoarthritis Index Version VA.1© para avaliar a dor de artrite. WOMAC 3.1TM consiste em 24 questões divididas em 3 domínios: dor (5 questões), rigidez (2 questões), e função física (17 ques-

tões). Bellamy et al., J. Rheumatol 15:1833-40 (1988); e Bellamy, Semin. Arthritis Rheum. 18:14-7 (1989). O domínio da função física proporciona informação da capacidade para realizar as atividades da vida diária. Os pacientes realizaram o ensaio diretamente no diário eletrônico durante visitas clínicas designadas, usando VAS eletrônico validado variando de 0-100 com 101 pontos de resolução. Cada domínio foi classificado determinando as médias dos escores de VAS das questões componentes. O WOMAC 3.1TM total foi classificado determinando as médias dos escores de cada um dos 3 domínios. Os pacientes também foram instruídos a relatar medicação de auxílio usada através do diário eletrônico.

O resultado foi avaliado como alteração da linha de base (nível de dor durante o período de triagem), expressado como diferença da intensidade da dor (PID) ou soma da diferença da intensidade da dor (SPID) para diferentes níveis de dose. As alterações da linha de base nas medições da atividade foram analisadas usando uma análise do modelo de covariância (ANCOVA) com tratamento como o fator principal e dor basal como um covariado. Para médias e alterações médias, foram feitas comparações do anticorpo E3 com placebo usando ensaio de Dunnett. Foi usado ensaio de tendência de Tukey-Ciminera-Heyse para avaliar a relação dose-resposta.

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

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

ti-NGF E3.

Tabela 23. Soma das diferenças da intensidade da dor para intervalos de tempo variáveis comparada com a linha de base.

	Dias 2-8	Dias 2-14	Dias 2-21	Dias 2-28
Placebo	-269	-486	-758	-1055
3 µg/kg	-572 (0,11) (0,43)	-956 (0,18) (0,62)	-1048 (0,63) (0,99)	-1067 (0,99) (1,00)
10 µg/kg	-671 (0,04) (0,17)	-1174 (0,05) (0,24)	-1623 (0,15) (0,55)	-2020 (0,29) (0,81)
30 µg/kg	-733 (0,02) (0,09)	-1371 (0,02) (0,08)	-2042 (0,04) (0,17)	-2566 (0,10) (0,40)
100 µg/kg	-766 (< 0,01) (0,02)	-1403 (<0,01) (0,02)	-1996 (0,02) (0,10)	-2726 (0,04) (0,17)
300 µg/kg	-769 (<0,01) (0,02)	-1340 (< 0,01) (0,04)	-1869 (0,04) (0,17)	-2521 (0,07) (0,29)
Todos	-713 (<0,01) (< 0,01)	-1269 (<0,01) (< 0,01)	-1752 (0,01) (0,06)	-2254 (0,04) (0,18)

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

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

Conforme mostrado na Figura 27, a administração de anticorpo anti-NGF E3 também reduziu o escore WOMAC do dia 1 ao dia 28. O escore

de dor, função física e rigidez foi reduzido significativamente em dose de 100 µg/kg de E3. Estes dados indicam que a administração única de anticorpo anti-NGF não somente reduz a dor, mas também melhora a função física e a rigidez em pacientes tendo osteoartrite.

Depósito de Material Biológico

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

Material		No. de Acesso ATCC	Data de Depósito
Eb.911.3E	cadeia leve de E3	PTA-4893	8 de janeiro de 2003
Eb.pur.911.3E	cadeia leve de E3	PTA-4894	8 de janeiro de 2003
Db.911.3E	cadeia pesada de E3	PTA-4895	8 de janeiro de 2003

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

Este depósito foi feito segundo as estipulações do Tratado de Budapest acerca do Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para fins de Procedimento de Patente e de Regulamentações subordinadas (*International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder* (Tratado de Budapest)). Este garante a manutenção de uma cultura viável do depósito por 30 anos da data de depósito. O depósito será tornado disponível pela ATCC sob os termos do Tratado de Budapest, e estará sujeito a um acordo entre Rinat Neuroscience Corp. e a ATCC, o qual garante disponibilidade permanente e irrestrita da progênie da cultura do depósito para o público na publicação da patente dos Estados Unidos pertinente ou na exposição ao público de qualquer pedido de patente dos Estados Unidos ou estrangeira, qualquer que venha primeiro, e assegura disponibilidade da progênie para

alguém determinado pelo Comissário de Patentes de Marcas Registradas dos Estados Unidos (*U.S. Commissioner of Patents and Trademarks*) a ser intitulado para isso de acordo com 35 USC Section 122 e as regras do Comissário de acordo para isso (inclusive 37 CFR Section 1.14 com particular referência a 886 OG 638).

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

Seqüências de anticorpos

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

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLI***GYDLN***WIRQPPGKGLEWIG***IIW GDGTTDYNSAVKS***RVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR***GGYWY ATSYYFDY***WGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 1)

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***RASQSISNNLN***WYQQKPGKAPKLLIY***YTS RFHS***GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC***QQEHTLPYT***FGQGTK LEIKRT (SEQ ID NO: 2)

CDRs estendidas de cadeia pesada E3

CDRH1: GFSLIGYDLN (SEQ ID NO: 3)

CDRH2: IIWGDGTTDYNSAVKS (SEQ ID NO: 4)

CDRH3: GGYWYATSYYFDY (SEQ ID NO: 5)

CDRs estendidas de cadeia leve E3

CDRL1: RASQSISNNLN (SEQ ID NO: 6)

CDRL2: YTSRFHS (SEQ ID NO: 7)

CDRL3: QQEHTLPYT (SEQ ID NO: 8)

CDRs estendidas 911 de anticorpo monoclonal de camundongo

CDRs estendidas de cadeia pesada 911

CDRH1 : GFSLIGYDIN (SEQ ID NO: 9)

CDRH2 : MIWGDGTTDYNSALKS (SEQ ID NO: 10)

CDRH3: GGYYYGTSYYFDY (SEQ ID NO: 11)

CDRs estendidas de cadeia leve 911

CDRL1: RASQDISNHLN (SEQ ID NO: 12)

CDRL2: YISRFHS (SEQ ID NO: 13)

CDRL3: QQSKTLPYT (SEQ ID NO: 14)

Seqüência de aminoácidos de cadeia pesada E3 (total)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIW
GDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWY
ATSYYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC
NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV
LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:
16)

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS
RFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTK
LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHXVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC(SEQ ID NO: 17)

Seqüência de nucleotídeos de cadeia pesada 3E (anticorpo total)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGA
GACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACTTATCGGCTAT
GATCTTAACTGGATCCGACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATT
GGGATTATCTGGGGTGATGGAACCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAAT
CCCGCGTCACCATCTCAAAAGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAA
GCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAG

AGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAG
GGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCTGTC
TTCCCACTGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCTGTGACCGTGTCC
TGGAACTCTGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTC
CTGCAGTCCTCAGGTCTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCA
TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGC
CAAGCAACACCAAGGTCGACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGTTGTGTGG
AGTGTCCACCTTGTCCAGCCCCTCCAGTGGCCGGACCATCCGTGTTCC
TGTTCCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCCAGAACCCCAGA
GGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGC
AGTTCAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCA
AGCCAAGAGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTTCAGAGTGGTGAGCGTGC
TGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTA
AGGTGTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGCATCGAGAAGACCATCTCCA
AGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATACCCTGCCACCAT
CCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGA
AGGGATTCTATCCATCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGAC
AGCCAGAGAACAACTATAAGACCACCCCTCCAATGCTGGACTCCGACG
GATCCTTCTTCCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCA
GCAGGGAAACGTGTTCTCTTGTTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA
CCACTATACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCAGGAAAGTAA(SEQ ID NO: 65)

Seqüência de nucleotídeos de domínio variável de cadeia pesada 3E

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGA
GACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACTTATCGGCTAT
GATCTTAACTGGATCCGACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATT
GGGATTATCTGGGGTGATGGAACCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAAT
CCCGCGTCACCATCTCAAAAGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAA
GCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAG
AGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAG
GGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO: 66)

Seqüência de nucleotídeos de cadeia leve 3E (anticorpo total)

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTG
ACCGCGTCACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCT
GAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACTCCTGATCTAC
TACACCTCACGCTTCCACTCAGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTG
GCTCTGGTACAGATTTCACCTTCACCATTAGCAGCCTGCAACCAGAAGA
TATTGCCACTTATTACTGCCAACAGGAGCATACCCTTCCATATACCTTCG
GTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGCACTGTGGCTGCACCATCTG
TCTTCATCTTTCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCGGAACTGCCTCT
GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCACGCGAGGCCAAAGTACAGT
GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA
CCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACMAAGTCTACGCCTGCGAAG
TCACCCATCAGGGCCTGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCG
GTGAGTGCTAA(SEQ ID NO: 67)

Seqüência de nucleotídeos de domínio variável de cadeia leve 3E

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTG
ACCGCGTCACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCT
GAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACTCCTGATCTAC
TACACCTCACGCTTCCACTCAGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTG
GCTCTGGTACAGATTTCACCTTCACCATTAGCAGCCTGCAACCAGAAGA
TATTGCCACTTATTACTGCCAACAGGAGCATACCCTTCCATATACCTTCG
GTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGC(SEQ ID NO: 68)

Entende-se que os exemplos e modalidades descritos aqui, são para fins ilustrativos somente e que serão sugeridas várias modificações ou alterações a luz dos mesmos às pessoas versadas na arte e devem ser incluídas dentro do espírito e do campo de ação deste pedido.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

<110> RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION
ROSENTHAL, Arnon
SHELTON, David L.
WALICKE, Patricia A.

<120> MÉTODOS PARA TRATAR DOR DE OSTEOARTRITE ADMINISTRANDO UM ANTAGONISTA DE FATOR DE CRESCIMENTO NERVOSO E COMPOSIÇÕES CONTENDO O MESMO

<130> 514712001460

<140> PCT/US2006/013921

<141> 2005-04-11

<150> US 11/104,248

<151> 2006-04-11

<160> 77

<170> FastSEQ for Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 1

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
20 25 30

Asp Leu Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 2

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 3

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Leu Asn

1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 4

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val Lys Ser

1 5 10 15

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 5

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 7

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 8

Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ile Asn

1 5 10

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn His Leu Asn

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Tyr Ile Ser Arg Phe His Ser

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 16

<211> 447

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr

20 25 30

Asp Leu Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys

210 215 220

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 17

<211> 214

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> VARIANT

<222> 190

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Xaa Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Seqüência artificial
<220>
<223> Construção sintética
<400> 18
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu Asn
1 5 10

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Seqüência artificial
<220>
<223> Construção sintética
<400> 19
Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser
1 5

<210> 20
<211> 11

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Asn His Leu Asn

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 21

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser

1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Gln Leu Asn

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 23

Tyr Val Ser Arg Phe His Ser

1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 24

Arg Ala Phe Gln Ala Ile Ser Asn Gln Leu Asn

1 5 10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 25

Tyr Ile Ser Arg Phe His Thr

1 5

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 26

Arg Ala Phe Gln Ser Ile Ser Asn Gln Leu Asn

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 27

Tyr Ala Ser Arg Phe His Ser

1 5

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 28

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ser Asn

1 5 10

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 29

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu

1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 30

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Leu Asn

1 5 10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 31

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val

1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 32

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Thr

1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 33

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val

1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 34

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Thr

1 5 10

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 35

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val

1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 36

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ala Thr

1 5 10

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 37

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val

1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 38

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Ser

1 5 10

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 39

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val

1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 40

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ile Ser

1 5 10

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 41

Gln Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val

1 5 10

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 42

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ala Ser

1 5 10

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 43

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val

1 5 10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 44

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ser Thr

1 5 10

<210> 45

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 45

Ser Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu

1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 46

Gly Gly Tyr Trp Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 47

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 48

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 49

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 50

Gln Gln Glu Lys Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 51

Gln Gln Glu Ala Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 52

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 53

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 54

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 55

Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 56

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 57

Gln Gln Glu Ser Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 58

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ser Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 59

Gln Gln Glu Lys Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 60

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 61

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 62

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 62

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 63

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 64

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 65

<211> 1344

<212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 65

caggtgcagc tgcaggagtc tggcccagga ctggtgaagc cttccgagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctgggtt ctcacttatc ggctatgatc ttaactggat ccgacagcct 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggatt atctggggtg atggaaccac agactataat 180

tcagctgtca aatcccgcgt caccatctca aaagacacct ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggaggttat 300

tggtacgcca ctagctacta ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 360

tcagcctcca ccaagggccc atctgtcttc ccactggccc catgctcccg cagcacctcc 420

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tcccagaacc tgtgaccgtg 480

tcctggaact ctggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtcc 540

tcaggtctct actccctcag cagcgtggtg accgtgccat ccagcaactt cggcacccag 600

acctacacct gcaacgtaga tcacaagcca agcaacacca aggtcgacaa gaccgtggag 660

agaaagtgtt gtgtggagtg tccaccttgt ccagccctc cagtggccgg accatccgtg 720

ttcctgttcc ctccaaagcc aaaggacacc ctgatgatct ccagaacccc agaggtgacc 780

tgtgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtgc agttcaactg gtatgtggac 840

ggagtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccaagagagg agcagttcaa ctccaccttc 900

agagtggtga gcgtgctgac cgtggtgcac caggactggc tgaacggaaa ggagtataag 960

tgtaaggtgt ccaacaaggg actgccatcc agcatcgaga agaccatctc caagaccaag 1020

ggacagccaa gagagccaca ggtgtatacc ctgccaccat ccagagagga gatgaccaag 1080

aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggattctatc catccgacat cgccgtggag 1140

tgggagtcca acggacagcc agagaacaac tataagacca cccctccaat gctggactcc 1200

gacggatcct tcttcctgta ttccaagctg accgtggaca agtccagatg gcagcaggga 1260

aacgtgttct cttgttccgt gatgcacgag gccctgcaca accactatac ccagaagagc 1320

ctgtccctgt ctccaggaaa gtaa 1344

<210> 66

<211> 363

<212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 66

caggtgcagc tgcaggagtc tggcccagga ctggtgaagc cttccgagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctgggtt ctcacttatc ggctatgatc ttaactggat ccgacagcct 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggatt atctggggtg atggaaccac agactataat 180

tcagctgtca aatcccgcgt caccatctca aaagacacct ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggaggttat 300

tggtacgcca ctagctacta ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 67

<211> 645

<212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 67

gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggtga ccgcgtcacc 60

atcacctgcc gcgcatctca gtccattagc aataatctga actggtatca gcagaagcca 120

ggcaaagccc caaaactcct gatctactac acctcacgct tccactcagg tgtcccatca 180

cgcttcagtg gcagtggctc tggtacagat ttcaccttca ccattagcag cctgcaacca 240

gaagatattg ccacttatta ctgccaacag gagcataccc ttccatatac cttcggtcaa 300

ggcaccaagc tggagatcaa acgcactgtg gctgcaccat ctgtcttcat ctttcctcca 360

tctgatgagc agttgaaatc cggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

ccacgcgagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatccgg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacmaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagttctc cagtcacaaa gagcttcaac cgcggtgagt gctaa 645

<210> 68

<211> 324

<212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 68

gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggtga ccgcgtcacc 60

atcacctgcc gcgcatctca gtccattagc aataatctga actggtatca gcagaagcca 120

ggcaaagccc caaaactcct gatctactac acctcacgct tccactcagg tgtcccatca 180

cgcttcagtg gcagtggctc tggtacagat ttcaccttca ccattagcag cctgcaacca 240

gaagatattg ccacttatta ctgccaacag gagcataccc ttccatatac cttcggtcaa 300

ggcaccaagc tggagatcaa acgc 324

<210> 69

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly

<210> 70

<211> 120

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 70

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120

<210> 71

<211> 120

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 71

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr

20 25 30

Asp Ile Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120

<210> 72

<211> 120

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 72

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
20 25 30

Asp Leu Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 73

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
85 90 95

<210> 74
<211> 109
<212> PRT
<213> Seqüência artificial
<220>
<223> Construção sintética
<400> 74
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn His
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ile Ser Arg Phe His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 75
<211> 109
<212> PRT
<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 75

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 76

<211> 1429

<212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 76

atggccaccg actccagaac ctcctggctg ctgacagtgt ccctgctgtg tctgctgtgg 60

ccacaggagg ccagcgctca ggtgcagctg caggagtctg gcccaggact ggtgaagcct 120

tccgagaccc tgtccctcac ctgcactgtc tctgggttct cacttatcgg ctatgatctt 180

aactggatcc gacagcctcc agggaaggga ctggagtgga ttgggattat ctggggtgat 240

ggaaccacag actataattc agctgtcaaa tcccgcgtca ccatctcaaa agacacctcc 300

aagaaccagt tctccctgaa gctgagctct gtgaccgccg cggacacggc cgtgtattac 360

tgtgcgagag gaggttattg gtacgccact agctactact ttgactactg gggccagggc 420

accctggtca ccgtctcctc agcctccacc aagggcccat ctgtcttccc actggcccca 480

tgctcccgca gcacctccga gagcacagcc gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc 540

ccagaacctg tgaccgtgtc ctggaactct ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc 600

ccagctgtcc tgcagtcctc aggtctctac tccctcagca gcgtggtgac cgtgccatcc 660

agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc aacgtagatc acaagccaag caacaccaag 720

gtcgacaaga ccgtggagag aaagtgttgt gtggagtgtc caccttgtcc agcccctcca 780

gtggccggac catccgtgtt cctgttccct ccaaagccaa aggacaccct gatgatctcc 840

agaaccccag aggtgacctg tgtggtggtg gacgtgtccc acgaggaccc agaggtgcag 900

ttcaactggt atgtggacgg agtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc aagagaggag 960

cagttcaact ccaccttcag agtggtgagc gtgctgaccg tggtgcacca ggactggctg 1020

aacggaaagg agtataagtg taaggtgtcc aacaagggac tgccatccag catcgagaag 1080

accatctcca agaccaaggg acagccaaga gagccacagg tgtataccct gccaccatcc 1140

agagaggaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggtgaaggg attctatcca 1200

tccgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac ggacagccag agaacaacta taagaccacc 1260

cctccaatgc tggactccga cggatccttc ttcctgtatt ccaagctgac cgtggacaag 1320

tccagatggc agcagggaaa cgtgttctct tgttccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1380

cactataccc agaagagcct gtccctgtct ccaggaaagt aattctaga 1429

<210> 77

<211> 729

<212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> 646

<223> m = A ou C

<400> 77

atggccaccg actccagaac ctcctggctg ctgacagtgt ccctgctgtg tctgctgtgg 60

ccacaggagg ccagcgctga tatccagatg acacagtccc catcctccct gtctgcctct 120

gtgggtgacc gcgtcaccat cacctgccgc gcatctcagt ccattagcaa taatctgaac 180

tggtatcagc agaagccagg caaagcccca aaactcctga tctactacac ctcacgcttc 240

cactcaggtg tcccatcacg cttcagtggc agtggctctg gtacagattt caccttcacc 300

attagcagcc tgcaaccaga agatattgcc acttattact gccaacagga gcataccctt 360

ccatatacct tcggtcaagg caccaagctg gagatcaaac gcactgtggc tgcaccatct 420

gtcttcatct ttcctccatc tgatgagcag ttgaaatccg gaactgcctc tgttgtgtgc 480

5 ctgctgaata acttctatcc acgcgaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 540

caatccggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600

ctcagcagca ccctgaccct gagcaaagca gactacgaga aacacmaagt ctacgcctgc 660

gaagtcaccc atcagggcct gagttctcca gtcacaaaga gcttcaaccg cggtgagtgc 720

taattctag 729

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar dor de osteoartrite em um indivíduo compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um antagonista NGF ao indivíduo.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o indivíduo é um humano.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o antagonista de NGF é um anticorpo antagonista anti-NGF.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma freqüência de dosagem dentro de um alcance a partir de uma vez a cada semana até uma vez a cada doze semanas.

5. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, uma vez a cada quatro meses, uma vez a cada cinco meses, ou uma vez a cada seis meses.

6. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada três meses.

7. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a dor é aliviada por uma duração de no mínimo cerca de sete dias depois da administração de uma única dose do anticorpo antagonista anti-NGF.

8. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a dor é aliviada por uma duração de no mínimo cerca de quatorze dias depois da administração de uma única dose do anticorpo antagonista anti-NGF.

9. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a dor é aliviada por uma duração de no mínimo cerca de quatro semanas depois da administração de uma única dose do anticorpo antagonista anti-NGF.

10. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a dor é aliviada por uma duração de no mínimo cerca de doze semanas depois da administração de uma única dose do anticorpo antagonista anti-NGF.

11. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose dentro de um alcance a

partir de cerca de 3 µg/kg até cerca de 1 mg/kg.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose de cerca de 100 µg/kg.

13. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose de cerca de 300 µg/kg.

14. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado por via intravenosa.

15. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado por via subcutânea.

16. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo monoclonal.

17. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo humanizado.

18. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo antagonista anti-NGF liga NGF humano.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o anticorpo antagonista anti-NGF adicionalmente liga NGF de roedor.

20. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo antagonista anti-NGF:

(a) liga NGF com uma K_D de menos de cerca de 2 nM;

(b) inibe a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 100 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 15 pM de NGF humano; e

(c) inibe a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 10 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 1,5 pM de NGF.

21. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo antagonista anti-NGF compreende uma região variável de cadeia pesada

compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO:4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO:5.

22. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo antagonista anti-NGF compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO:6;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO:7; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO:8.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o anticorpo antagonista anti-NGF adicionalmente compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO:4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO:5.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos mostradas na SEQ ID NOS: 1 e 2.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos mostradas na SEQ ID NOS: 16 e 17.

26. Método para melhorar a função física em um indivíduo tendo osteoartrite compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF ao indivíduo.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, em que o indivíduo é um ser humano.

28. Método de acordo com a reivindicação 26, em que o antagonista de NGF é um anticorpo antagonista anti-NGF.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma freqüência de dosagem dentro de um alcance a partir de uma vez a cada semana até uma vez a ca-

da doze semanas.

30. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, uma vez a cada quatro meses, uma vez a cada cinco meses, ou uma vez a cada seis meses.

31. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada três meses.

32. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose dentro de um alcance a partir de cerca de 3 µg/kg até cerca de 1 mg/kg.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose de cerca de 100 µg/kg.

34. Método de acordo com a reivindicação 32, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose de cerca de 300 µg/kg.

35. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado por via intravenosa.

36. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado por via subcutânea.

37. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo monoclonal.

38. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo humanizado.

39. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo antagonista anti-NGF liga NGF humano.

40. Método de acordo com a reivindicação 39, em que o anticorpo antagonista anti-NGF adicionalmente liga NGF de roedor.

41. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo antagonista anti-NGF:

(a) liga NGF com uma K_D de menos de cerca de 2 nM;

(b) inibe a sobrevida dependente do fator de crescimento nervo-

so humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 100 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 15 pM de NGF humano; e

(c) inibe a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 10 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 1,5 pM de NGF.

42. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo antagonista anti-NGF compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO:4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO:5.

43. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo antagonista anti-NGF compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO:6;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO:7; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO:8.

44. Método de acordo com a reivindicação 43, em que o anticorpo antagonista anti-NGF adicionalmente compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO:4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO:5.

45. Método de acordo com a reivindicação 44, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos mostradas na SEQ ID NOS: 1 e 2.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos mostradas na SEQ ID NOS: 16 e 17.

47. Método para melhorar a rigidez em um indivíduo tendo oste-

oartrite compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF ao indivíduo.

48. Método de acordo com a reivindicação 47, em que o indivíduo é um humano.

49. Método de acordo com a reivindicação 47, em que o antagonista de NGF é um anticorpo antagonista anti-NGF.

50. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma freqüência de dosagem dentro de um alcance a partir de uma vez a cada semana até uma vez a cada doze semanas.

51. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, uma vez a cada quatro meses, uma vez a cada cinco meses, ou uma vez a cada seis meses.

52. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada três meses.

53. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose dentro de um alcance a partir de cerca de 3 µg/kg até cerca de 1 mg/kg.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose de cerca de 100 µg/kg.

55. Método de acordo com a reivindicação 53, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose de cerca de 300 µg/kg.

56. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado por via intravenosa.

57. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado por via subcutânea.

58. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo monoclonal.

59. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticor-

po antagonista anti-NGF é um anticorpo humanizado.

60. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo antagonista anti-NGF liga NGF humano.

61. Método de acordo com a reivindicação 60, em que o anticorpo antagonista anti-NGF adicionalmente liga NGF de roedor.

62. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo antagonista anti-NGF:

(a) liga NGF com uma K_D de menos de cerca de 2 nM;

(b) inibe a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 100 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 15 pM de NGF humano; e

(c) inibe a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 10 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 1,5 pM de NGF.

63. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo antagonista anti-NGF compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO:4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO:5.

64. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o anticorpo antagonista anti-NGF compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO:6;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO:7; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO:8.

65. Método de acordo com a reivindicação 64, em que o anticorpo antagonista anti-NGF adicionalmente compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO:4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO:5.

66. Método de acordo com a reivindicação 65, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos mostradas na SEQ ID NOS: 1 e 2.

67. Método de acordo com a reivindicação 66, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos mostradas na SEQ ID NOS: 16 e 17.

68. Kit compreende uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF e instruções para administrar uma quantidade eficaz do antagonista de NGF a um indivíduo para tratar dor de osteoartrite no indivíduo.

69. Kit de acordo com a reivindicação 68, em que o indivíduo é um humano.

70. Kit de acordo com a reivindicação 68, em que o NGF-antagonista é um anticorpo antagonista anti-NGF.

71. Kit de acordo com a reivindicação 70, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma freqüência de dosagem dentro de um alcance a partir de uma vez a cada semana até uma vez a cada doze semanas.

72. Kit de acordo com a reivindicação 70, em que a dor é aliviada por uma duração de no mínimo cerca de sete dias depois da administração de uma única dose do anticorpo antagonista anti-NGF.

73. Kit compreende uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF e instruções para administrar uma quantidade eficaz do antagonista de NGF a um indivíduo tendo osteoartrite para melhorar a função física no indivíduo.

74. Kit de acordo com a reivindicação 73, em que o indivíduo é um ser humano.

75. Kit de acordo com a reivindicação 73, em que o NGF-antagonista é um anticorpo antagonista anti-NGF.

76. Kit de acordo com a reivindicação 75, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma freqüência de dosagem dentro

de um alcance a partir de uma vez a cada semana até uma vez a cada doze semanas.

77. Kit de acordo com a reivindicação 75, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose dentro de um alcance a partir de cerca de 3 µg/kg até cerca de 1 mg/kg.

78. Kit compreende uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF e instruções para administrar uma quantidade eficaz do antagonista de NGF a um indivíduo tendo osteoartrite para melhorar a rigidez no indivíduo.

79. Kit de acordo com a reivindicação 78, em que o indivíduo é um ser humano.

80. Kit de acordo com a reivindicação 78, em que o NGF-antagonista é um anticorpo antagonista anti-NGF.

81. Kit de acordo com a reivindicação 80, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma freqüência de dosagem dentro de um alcance a partir de uma vez a cada semana até uma vez a cada doze semanas.

82. Kit de acordo com a reivindicação 80, em que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose dentro de um alcance a partir de cerca de 3 µg/kg até cerca de 1 mg/kg.

83. Composição farmacêutica compreendendo um antagonista de NGF e um veículo farmaceuticamente aceitável para tratar dor de osteo-artrite em um indivíduo.

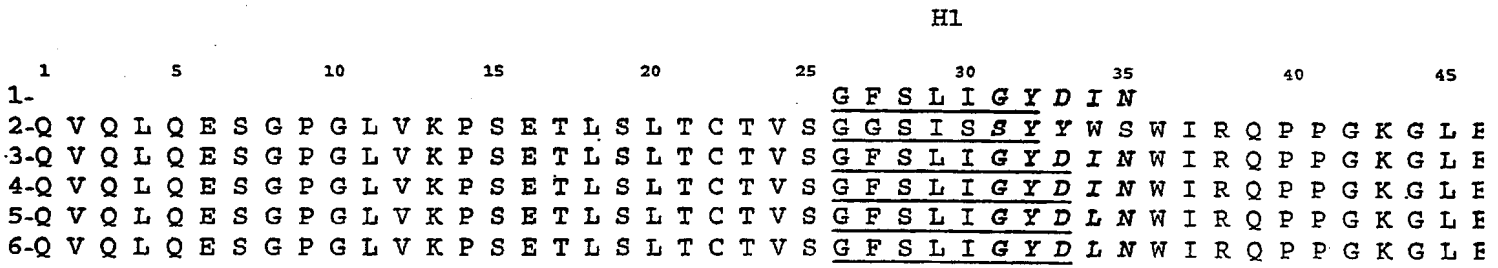
84. Composição farmacêutica compreendendo um antagonista de NGF e um veículo farmaceuticamente aceitável para melhorar a função física em um indivíduo tendo osteoartrite.

85. Composição farmacêutica compreendendo um antagonista de NGF e um veículo farmaceuticamente aceitável para melhorar a rigidez em um indivíduo tendo osteoartrite.

Fig. 1A

CDRs: ***negrito e itálico*** = Kabat; <u>sublinhado = Chothia</u>

1A) REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA
1 = anticorpo 911 de camundongo (CDRs)
2 = VH4 - linhagem germinativa aceitadora humana 59
3 = CDR enxertada
4 = 3 + uma mutação estrutural
5 = 4 + maturação de afinidade H1, H2
6 = 5 + maturação de afinidade H3 (região variável de cadeia pesada de anticorpo 3E)



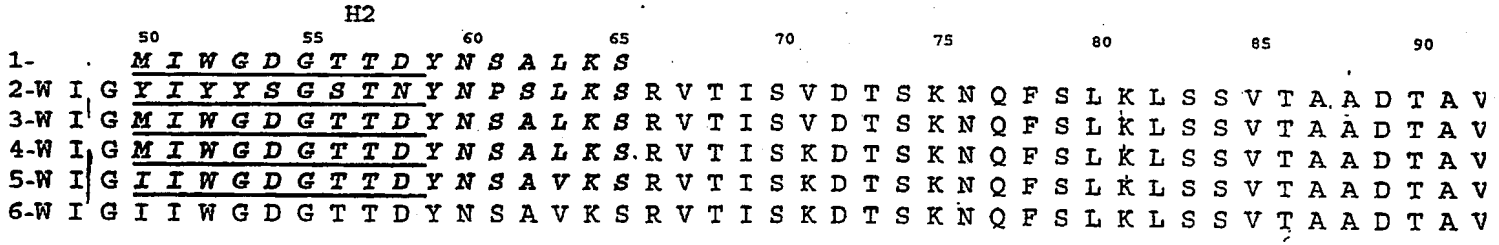


Fig. 1A (continuação)

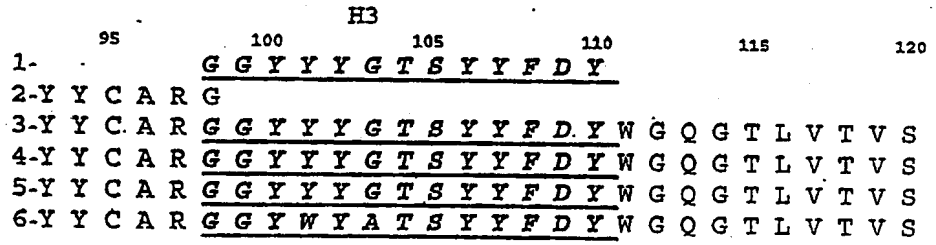


Fig. 1B

1B) REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA LEVE
1 = anticorpo 911 de camundongo (CDRs)
2 - linhagem germinativa aceitadora humana 08
3 = CDR enxertada
4 = 3 + maturação de afinidade L1, L2
5 = 4 + maturação de afinidade L3 (região variável de cadeia leve de anticorpo 3E)

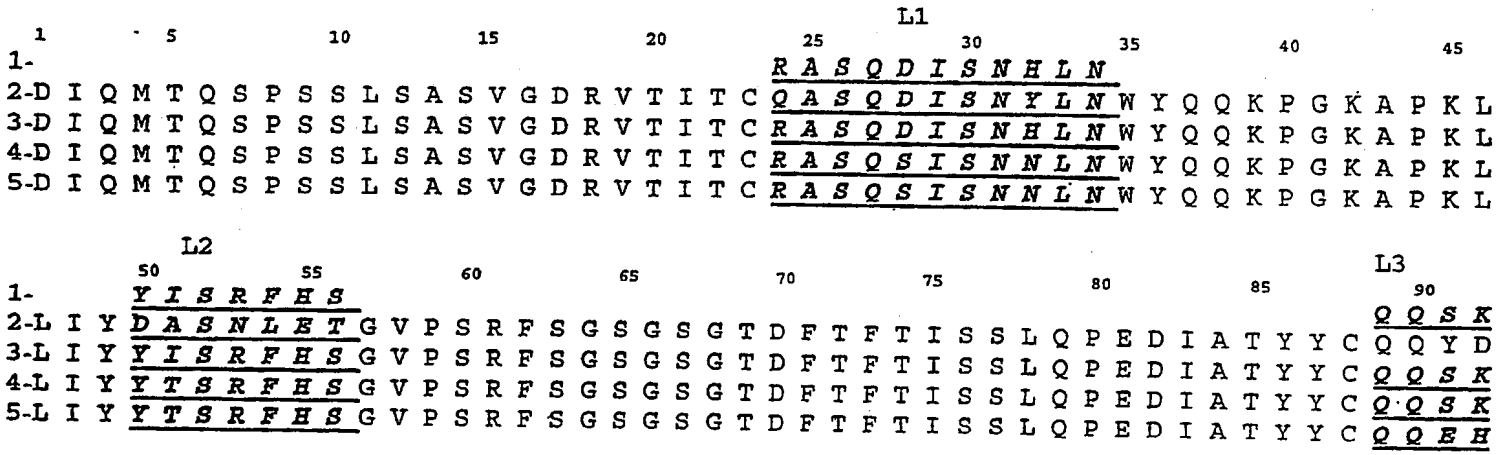


Fig. 1B (continuação)

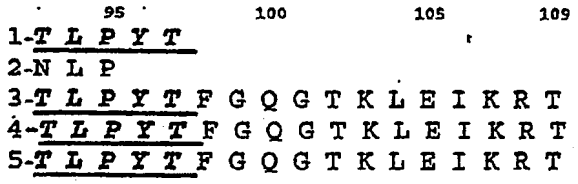


Fig. 2

Db.911.3E padrão; DNA circular; ; 1429 BP.
Este arquivo é criado por Vector NTI

http://www.informaxinc.com/
VNTDATE|285871584|
VNTDBDATE|285873257|
VNTAUTHORNAME|Demo User|
Sequence 1429 BP; 331 A; 440 C; 380 G; 278 t;

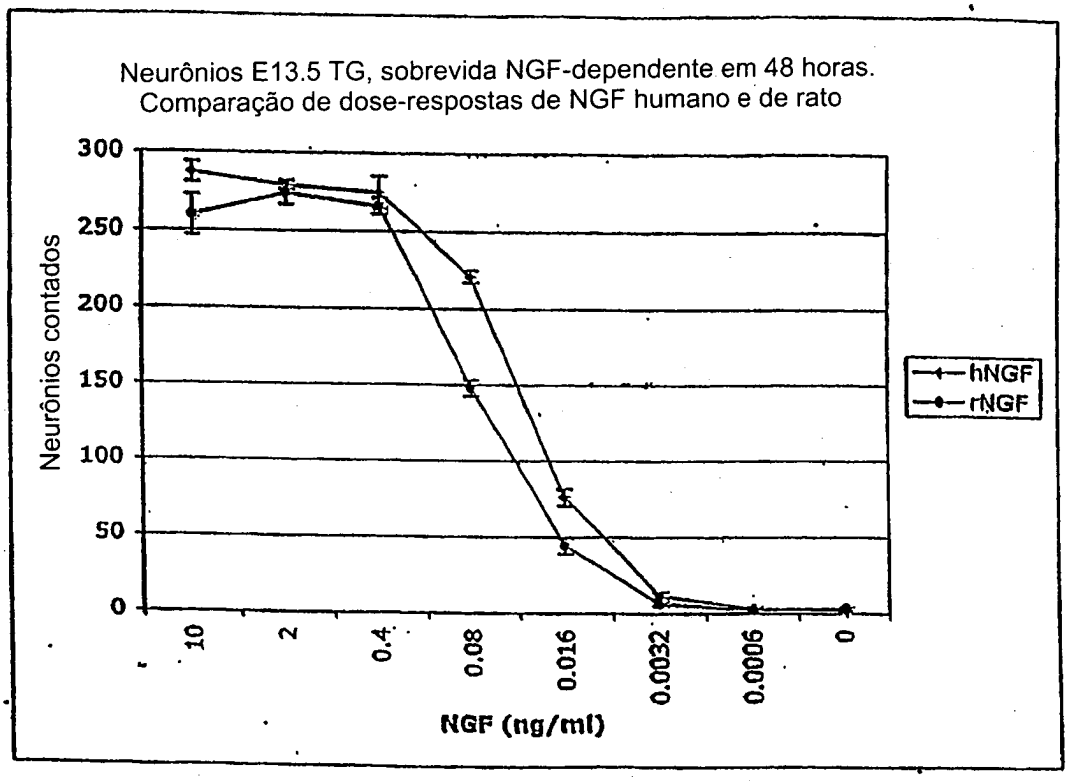
```
atggccaccg actccagaac ctcctggctg ctgacagtgt ccctgctgtg tctgctgtgg      60
ccacaggagg ccagcgctca ggtgcagctg caggagtctg gcccaggact ggtgaagcct     120
tccgagaccc tgtccctcac ctgcactgtc tctgggttct cacttatcgg ctatgatctt     180
aactggatcc gacagcctcc agggaaggga ctggagtgga ttgggattat ctggggtgat     240
ggaaccacag actataattc agctgtcaaa tcccgcgtca ccatctcaaa agacacctcc     300
aagaaccagt tctccctgaa gctgagctct gtgaccgccg cggacacggc cgtgtattac     360
tgtgcgagag gaggttattg gtacgccact agctactact ttgactactg gggccagggc     420
accctggtca ccgtctcctc agcctccacc aagggcccat ctgtcttccc actggcccca     480
tgctccccga gcacctccga gagcacagcc gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc     540
ccagaacctg tgaccgtgtc ctggaactct ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc     600
ccagctgtcc tgcagtcctc aggtctctac tccctcagca gcgtggtgac cgtgccatcc     660
agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc aacgtagatc acaagccaag caacaccaag     720
gtcgacaaga ccgtggagag aaagtgttgt gtggagtgtc caccttgtcc agccccctcca     780
gtggccggac catccgtgtt cctgttcccc ccaaagccaa aggacaccct gatgatctcc     840
agaaccccag aggtgacctg tgtggtggtg gacgtgtccc acgaggaccc agaggtgcag     900
ttcaactggt atgtggacgg agtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc aagagaggag     960
cagttcaact ccaccttcag agtggtgagc gtgctgaccg tggtgcacca ggactggctg    1020
aacggaaagg agtataagtg taaggtgtcc aacaagggac tgccatccag catcgagaag    1080
accatctcca agaccaaggg acagccaaga gagccacagg tgtataccct gccaccatcc    1140
agagaggaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggtgaaggg attctatcca    1200
tccgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac ggacagccag agaacaacta taagaccacc    1260
cctccaatgc tggactccga cggatccttc ttcctgtatt ccaagctgac cgtggacaag    1320
tccagatggc agcagggaaa cgtgttctct tgttccgtga tgcacgaggc cctgcacaac    1380
cactataccc agaagagcct gtccctgtct ccaggaaagt aattctaga                1429
```

Fig. 3

Eb.911.3E padrão; DNA circular; ; 729 BP.
Este arquivo é criado por Vector NTI

```
http://www.informaxinc.com/
VNTDATE|285871514|
VNTDBDATE|285872959|
VNTAUTHORNAME|Demo User|
Sequence 729 BP; 182 A; 231 C; 161 G; 154 t; 1 other;
atggccaccg actccagaac ctcctggctg ctgacagtgt ccctgctgtg tctgctgtgg      60
ccacaggagg ccagcgctga tatccagatg acacagtccc catcctccct gtctgcctct     120
gtgggtgacc gcgtcaccat cacctgccgc gcatctcagt ccattagcaa taatctgaac     180
tggtatcagc agaagccagg caaagcccca aaactcctga tctactacac ctcacgcttc     240
attagcagcc tgcaaccaga agatattgcc acttattact gccaacagga gcataccctt     300
ccatatacct tcggtcaagg caccaagctg gagatcaaac gcactgtggc tgcaccatct     360
gtcttcatct ttcctccatc tgatgagcag ttgaaatccg gaactgcctc tgttgtgtgc     420
ctgctgaata acttctatcc acgcgaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc     480
caatccggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc     540
ctcagcagca ccctgaccct gagcaaagca gactacgaga aacacmaagt ctacgcctgc     600
gaagtcaccc atcagggcct gagttctcca gtcacaaaga gcttcaaccg cggtgagtgc     660
taattctag                                                             720
                                                                      729
```

Fig. 4


Neurônios E13.5 TG, sobrevida NGF-dependente em 48 horas.
Comparação de dose-respostas de NGF humano e de rato
Neurônios contados
300
250
200
150
100
50
0
10
2
0.4
0.08
0.016
0.0032
0.0006
0
NGF (ng/ml)
hNGF
rNGF

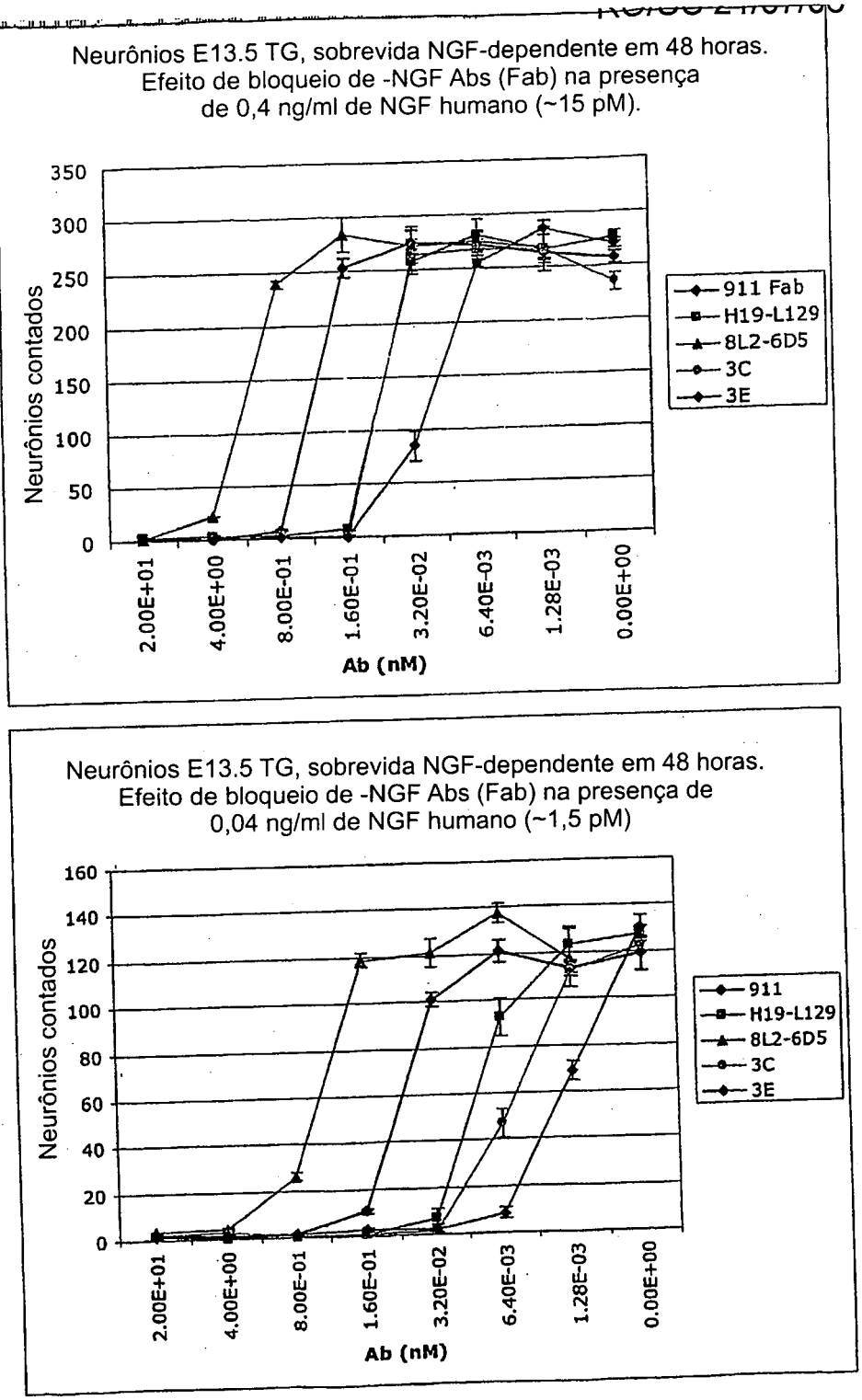
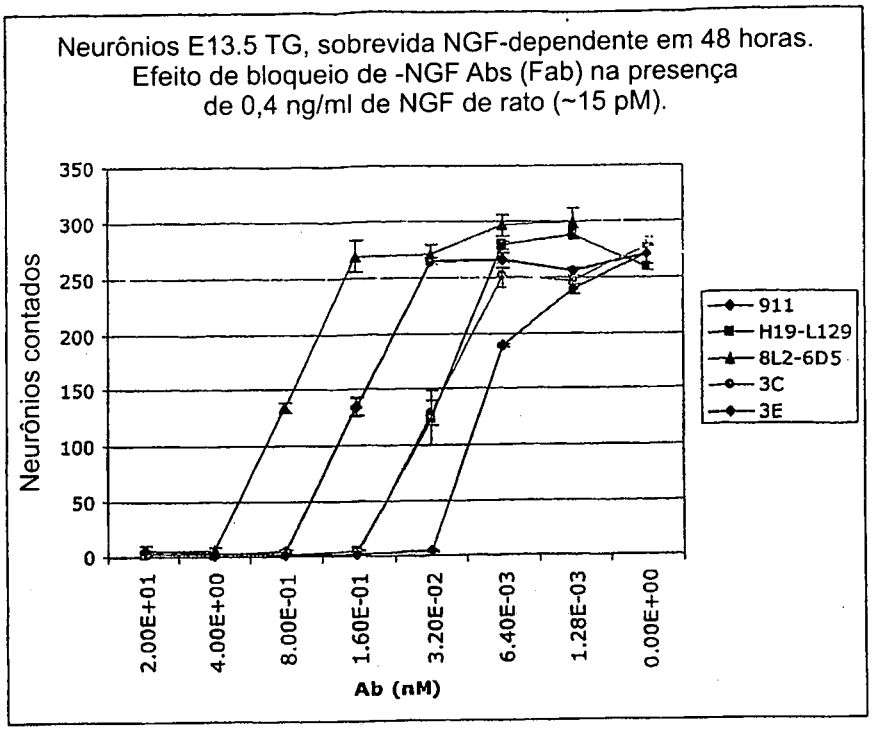

Neurônios E13.5 TG, sobrevida NGF-dependente em 48 horas.
Efeito de bloqueio de -NGF Abs (Fab) na presença
de 0,4 ng/ml de NGF humano (~15 pM).
Neurônios contados
350
300
250
200
150
100
50
0
2.00E+01
4.00E+00
8.00E-01
1.60E-01
3.20E-02
6.40E-03
1.28E-03
0.00E+00
Ab (nM)
911 Fab
H19-L129
8L2-6D5
3C
3E
Neurônios E13.5 TG, sobrevida NGF-dependente em 48 horas.
Efeito de bloqueio de -NGF Abs (Fab) na presença de
0,04 ng/ml de NGF humano (~1,5 pM)
Neurônios contados
160
140
120
100
80
60
40
20
0
2.00E+01
4.00E+00
8.00E-01
1.60E-01
3.20E-02
6.40E-03
1.28E-03
0.00E+00
Ab (nM)
911
H19-L129
8L2-6D5
3C
3E

Fig. 5


Neurônios E13.5 TG, sobrevida NGF-dependente em 48 horas.
Efeito de bloqueio de -NGF Abs (Fab) na presença
de 0,4 ng/ml de NGF de rato (~15 pM).
Neurônios contados
350
300
250
200
150
100
50
0
2.00E+01
4.00E+00
8.00E-01
1.60E-01
3.20E-02
6.40E-03
1.28E-03
0.00E+00
Ab (nM)
911
H19-L129
8L2-6D5
3C
3E

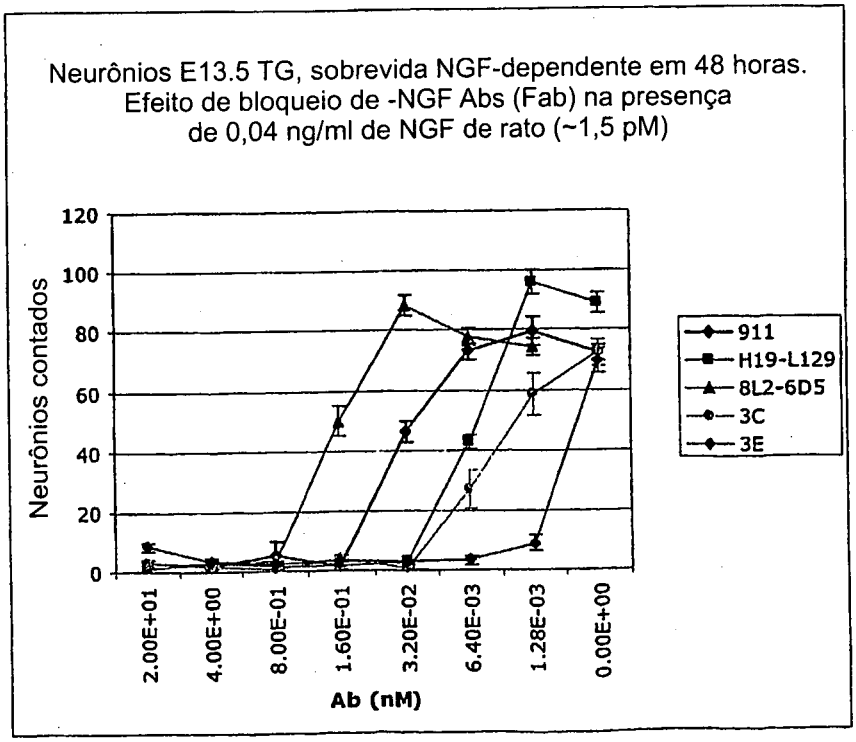

Neurônios E13.5 TG, sobrevida NGF-dependente em 48 horas.
Efeito de bloqueio de -NGF Abs (Fab) na presença
de 0,04 ng/ml de NGF de rato (~1,5 pM)
Neurônios contados
120
100
80
60
40
20
0
2.00E+01
4.00E+00
8.00E-01
1.60E-01
3.20E-02
6.40E-03
1.28E-03
0.00E+00
Ab (nM)
911
H19-L129
8L2-6D5
3C
3E

Fig. 6

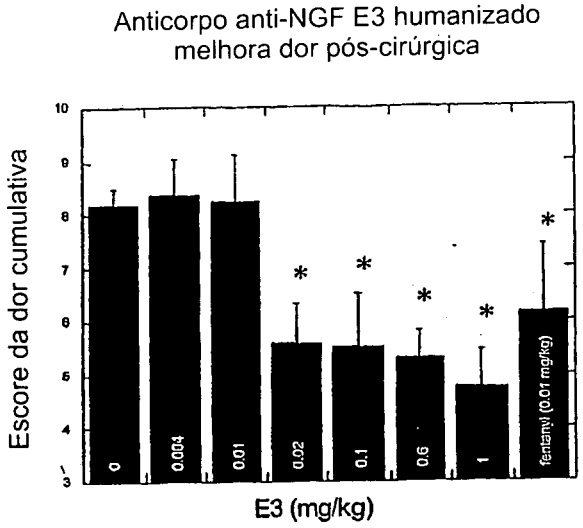

Anticorpo anti-NGF E3 humanizado
melhora dor pós-cirúrgica
Escore da dor cumulativa
10
9
8
7
6
5
4
3
0
0.004
0.01
0.02
0.1
0.6
1
fentanyl (0.01 mg/kg)
*
E3 (mg/kg)

Fig. 7

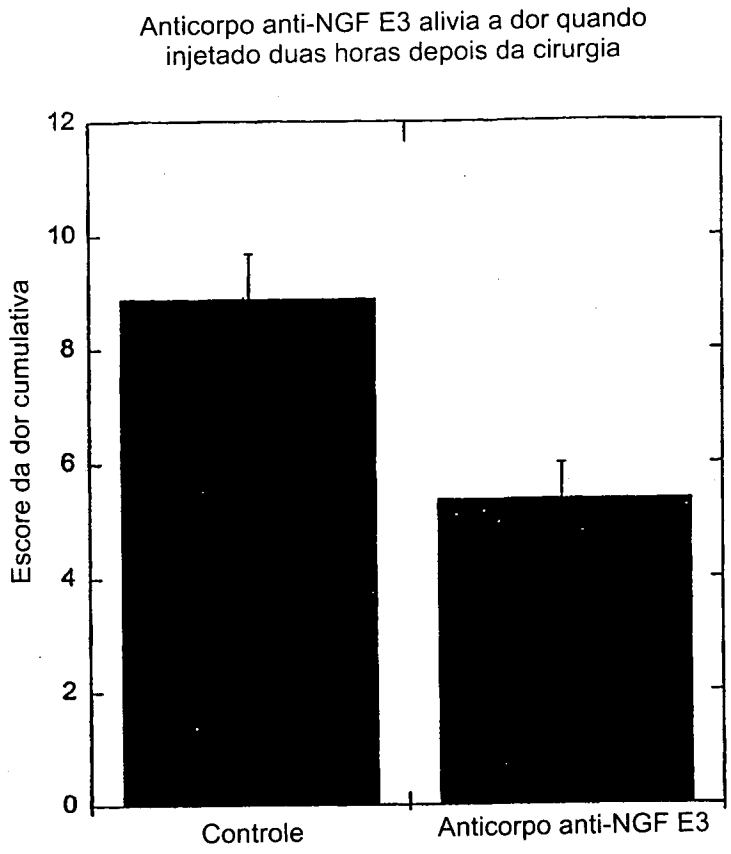

Anticorpo anti-NGF E3 alivia a dor quando injetado duas horas depois da cirurgia
Escore da dor cumulativa
12
10
8
6
4
2
0
Controle
Anticorpo anti-NGF E3
N = 8 por grupo
P<0,005

Fig. 8

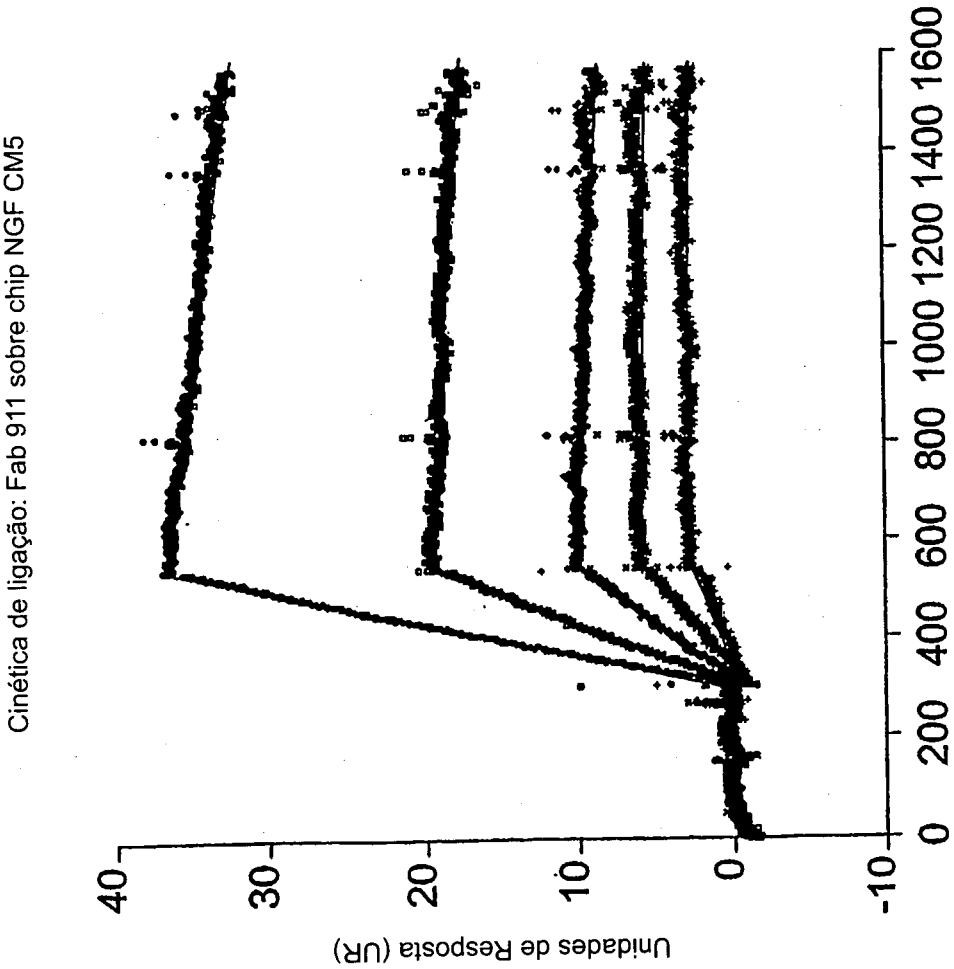

Cinética de ligação: Fab 911 sobre chip NGF CM5
k_{on} 2.2x10^{4} (1/Ms)
k_{off} 8.4x10^{-5} (1/s)
K_D 3,7 nM
Unidades de Resposta (UR)
40
30
20
10
0
-10
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
Tempo (s)

Fig. 9

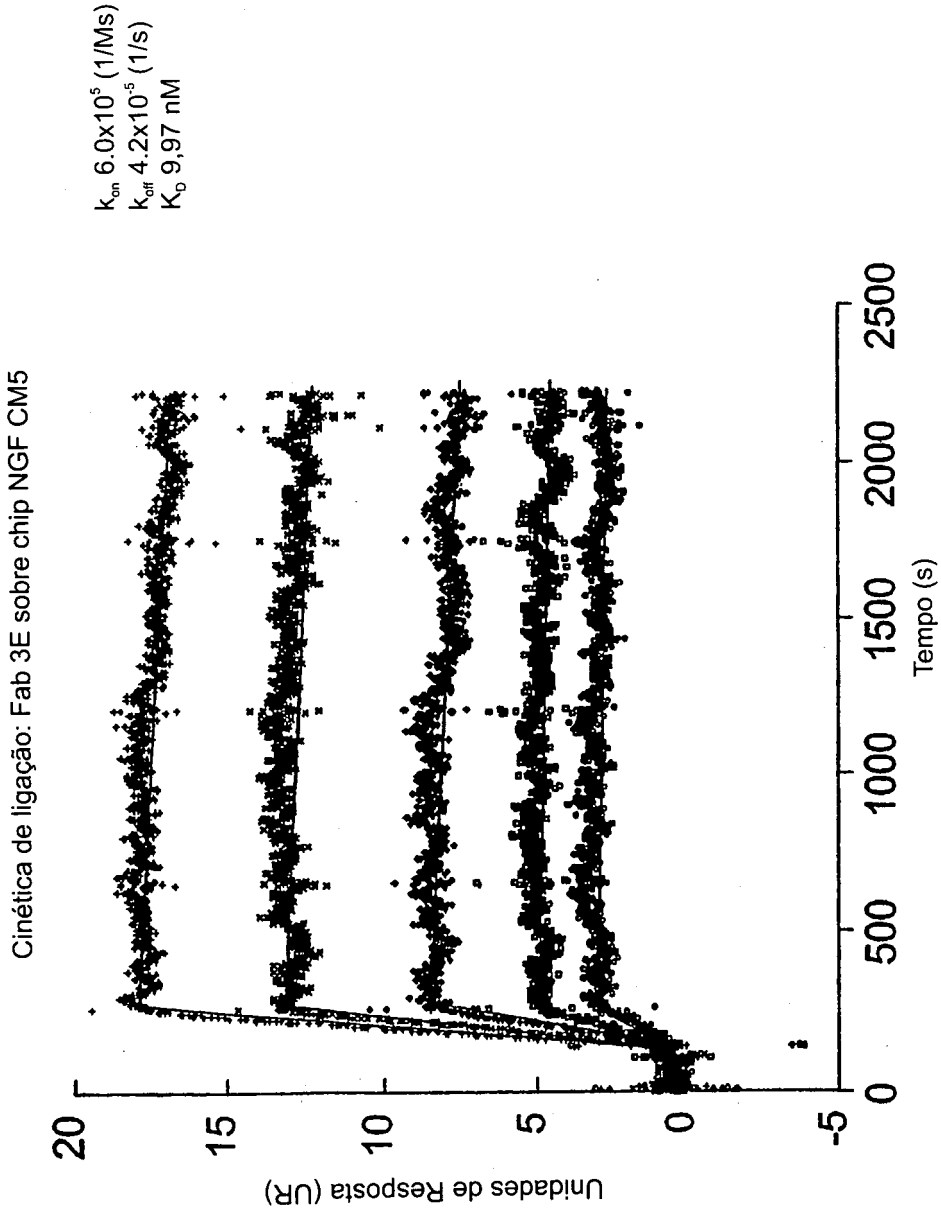

Cinética de ligação: Fab 3E sobre chip NGF CM5
k_{on} 6.0x10^5 (1/Ms)
k_{off} 4.2x10^{-5} (1/s)
K_D 9,97 nM
Unidades de Resposta (UR)
20
15
10
5
0
-5
0
500
1000
1500
2000
2500
Tempo (s)

Fig. 10

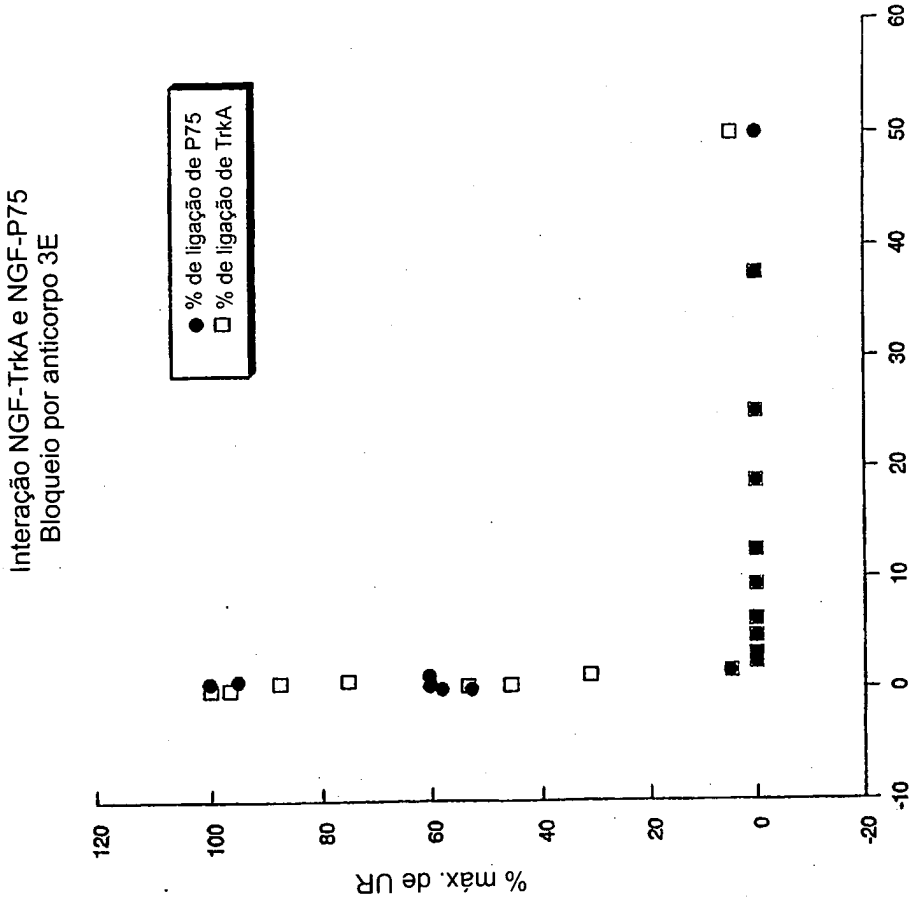

Interação NGF-TrkA e NGF-P75
Bloqueio por anticorpo 3E
● % de ligação de P75
□ % de ligação de TrkA
% máx. de UR
120
100
80
60
40
20
0
-20
-10
0
10
20
30
40
50
60
3E Fab nM

Fig. 11

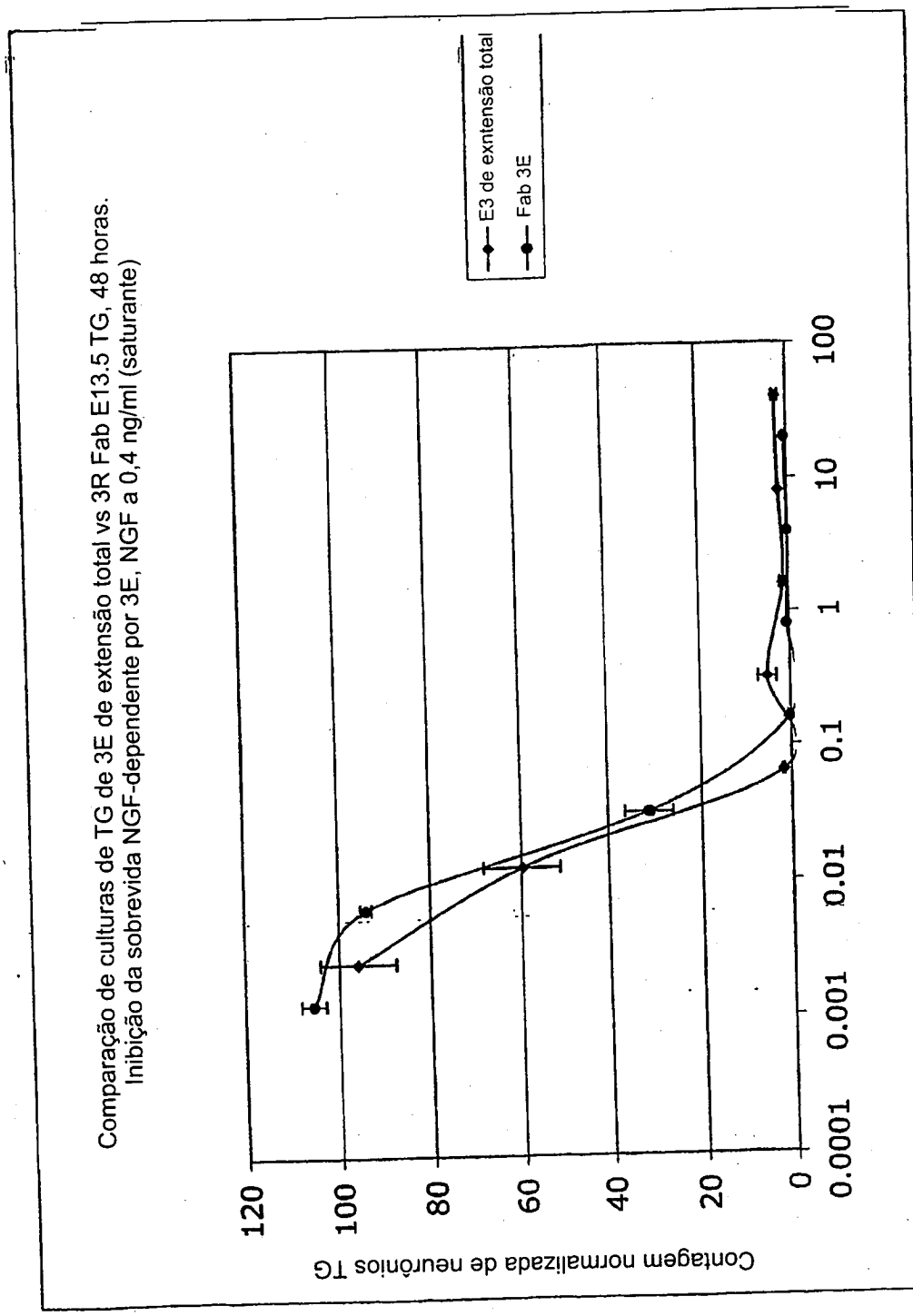

Comparação de culturas de TG de 3E de extensão total vs 3R Fab E13.5 TG, 48 horas.
Inibição da sobrevida NGF-dependente por 3E, NGF a 0,4 ng/ml (saturante)
E3 de exntensão total
Fab 3E
Contagem normalizada de neurônios TG
120
100
80
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Sítios de ligação (nM)

Fig. 12

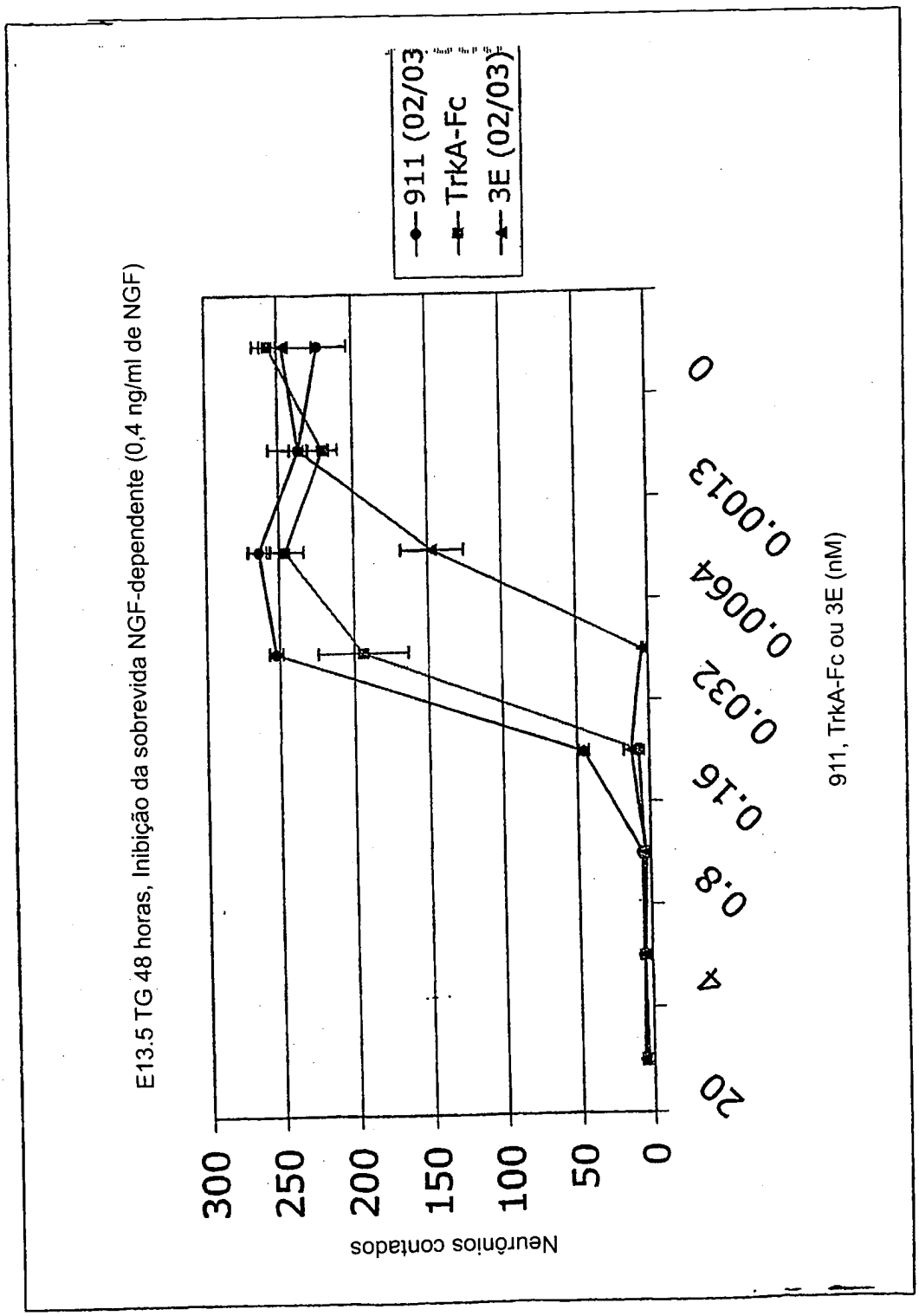

E13.5 TG 48 horas, Inibição da sobrevida NGF-dependente (0,4 ng/ml de NGF)
Neurônios contados
300
250
200
150
100
50
0
911 (02/03)
TrkA-Fc
3E (02/03)
20
4
0.8
0.16
0.032
0.0064
0.0013
0
911, TrkA-Fc ou 3E (nM)

Fig. 13

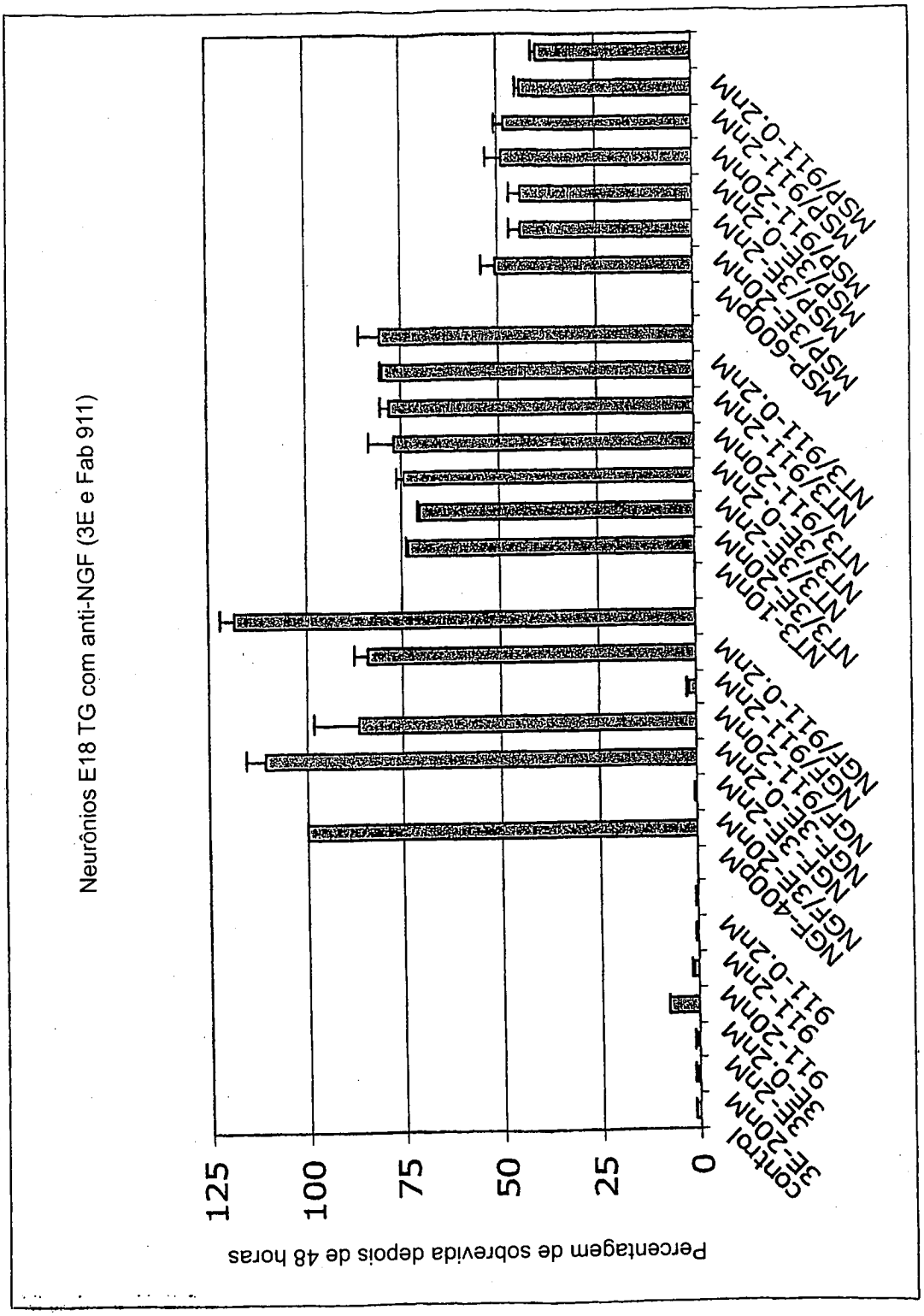

Neurônios E18 TG com anti-NGF (3E e Fab 911)
Percentagem de sobrevida depois de 48 horas
125
100
75
50
25
0
Controle
3E-20nM
3E-0.2nM
911-20nM
911-2nM
911-0.2nM
NGF-400pM
NGF/3E-20nM
NGF-3E-2nM
NGF-3E-0.2nM
NGF/911-20nM
NGF/911-2nM
NGF/911-0.2nM
NT3-10nM
NT3/3E-20nM
NT3/3E-2nM
NT3/3E-0.2nM
NT3/911-20nM
NT3/911-2nM
NT3/911-0.2nM
MSP-600pM
MSP/3E-20nM
MSP/3E-2nM
MSP/3E-0.2nM
MSP/911-20nM
MSP/911-2nM
MSP/911-0.2nM

Fig. 14

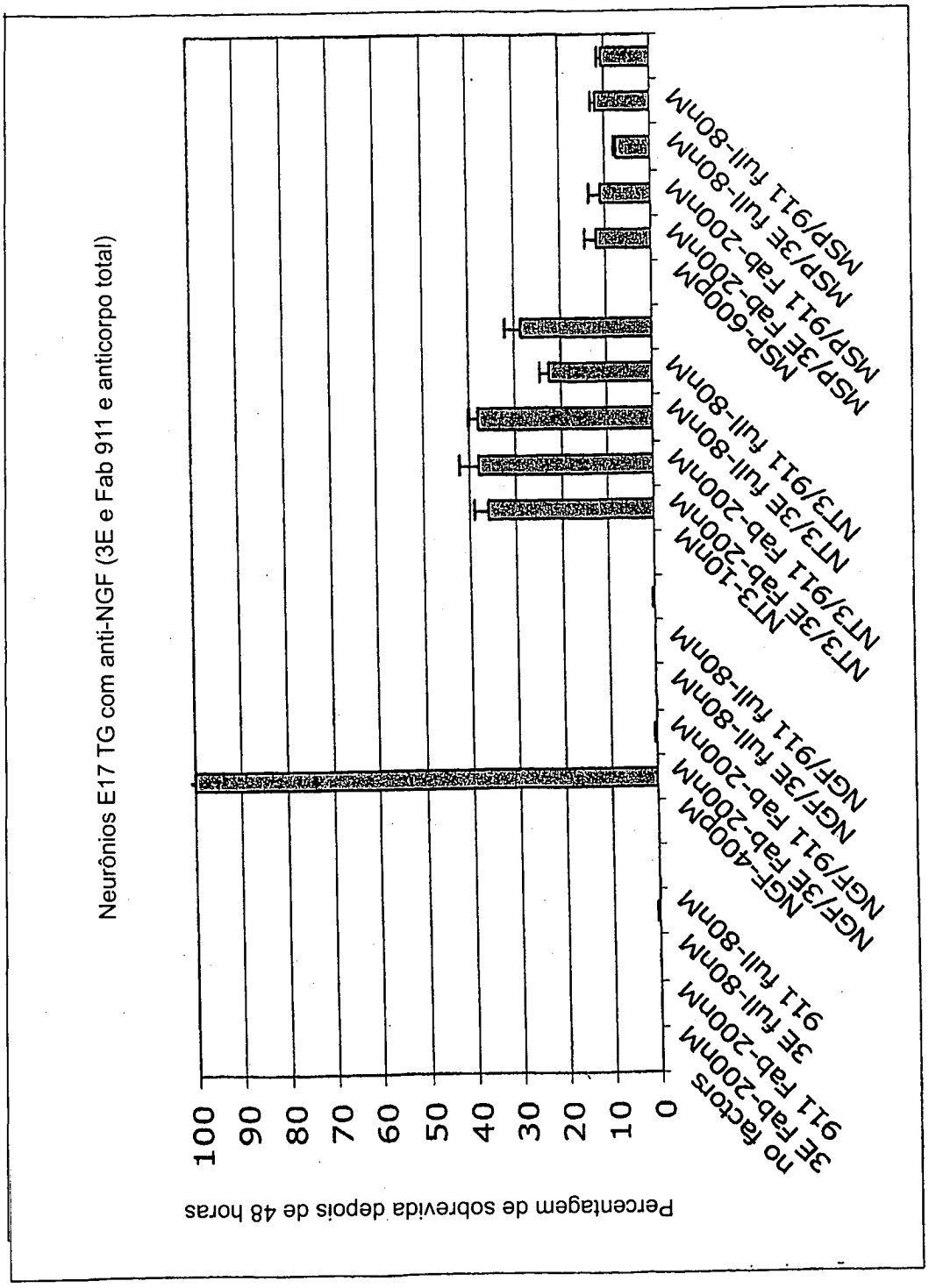

Neurônios E17 TG com anti-NGF (3E e Fab 911 e anticorpo total)
Percentagem de sobrevida depois de 48 horas
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
no factors
3E Fab-200nM
911 Fab-200nM
3E full-80nM
911 full-80nM
NGF-400pM
NGF/3E Fab-200nM
NGF/911 Fab-200nM
NGF/3E full-80nM
NGF/911 full-80nM
NT3-10nM
NT3/3E Fab-200nM
NT3/911 Fab-200nM
NT3/3E full-80nM
NT3/911 full-80nM
MSP-600pM
MSP/3E Fab-200nM
MSP/911 Fab-200nM
MSP/3E full-80nM
MSP/911 full-80nM

Fig. 15

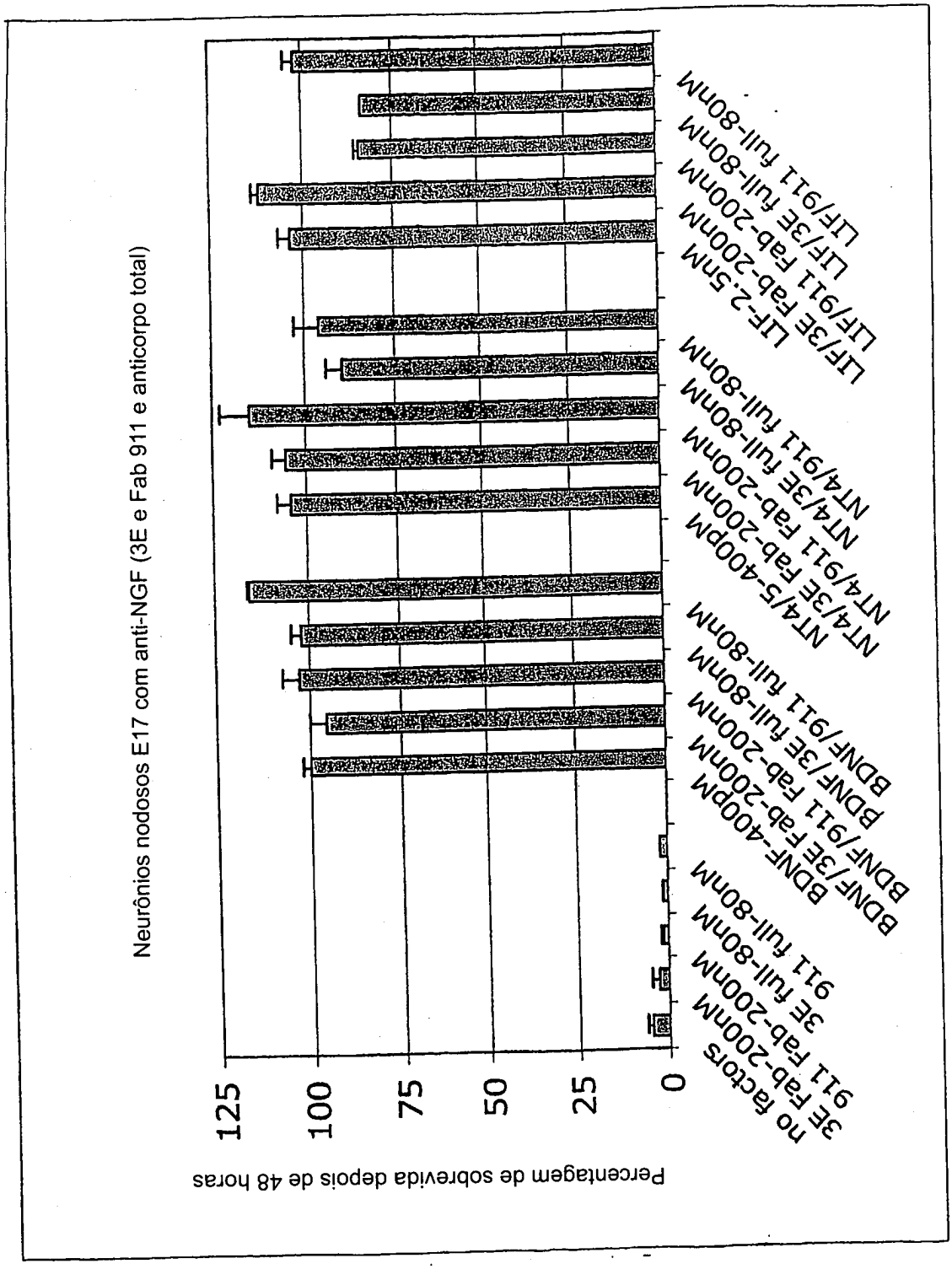

Neurônios nodosos E17 com anti-NGF (3E e Fab 911 e anticorpo total)
Percentagem de sobrevida depois de 48 horas
0
25
50
75
100
125
no factors
3E Fab-200M
911 Fab-200M
3E full-80M
911 full-80M
BDNF-400PM
BDNF/3E Fab-200M
BDNF/911 Fab-200M
BDNF/3E full-80M
BDNF/911 full-80M
NT4/5-400PM
NT4/3E Fab-200M
NT4/911 Fab-200M
NT4/3E full-80M
NT4/911 full-80M
LIF-2.5M
LIF/3E Fab-200M
LIF/911 Fab-200M
LIF/3E full-80M
LIF/911 full-80M

Fig. 16

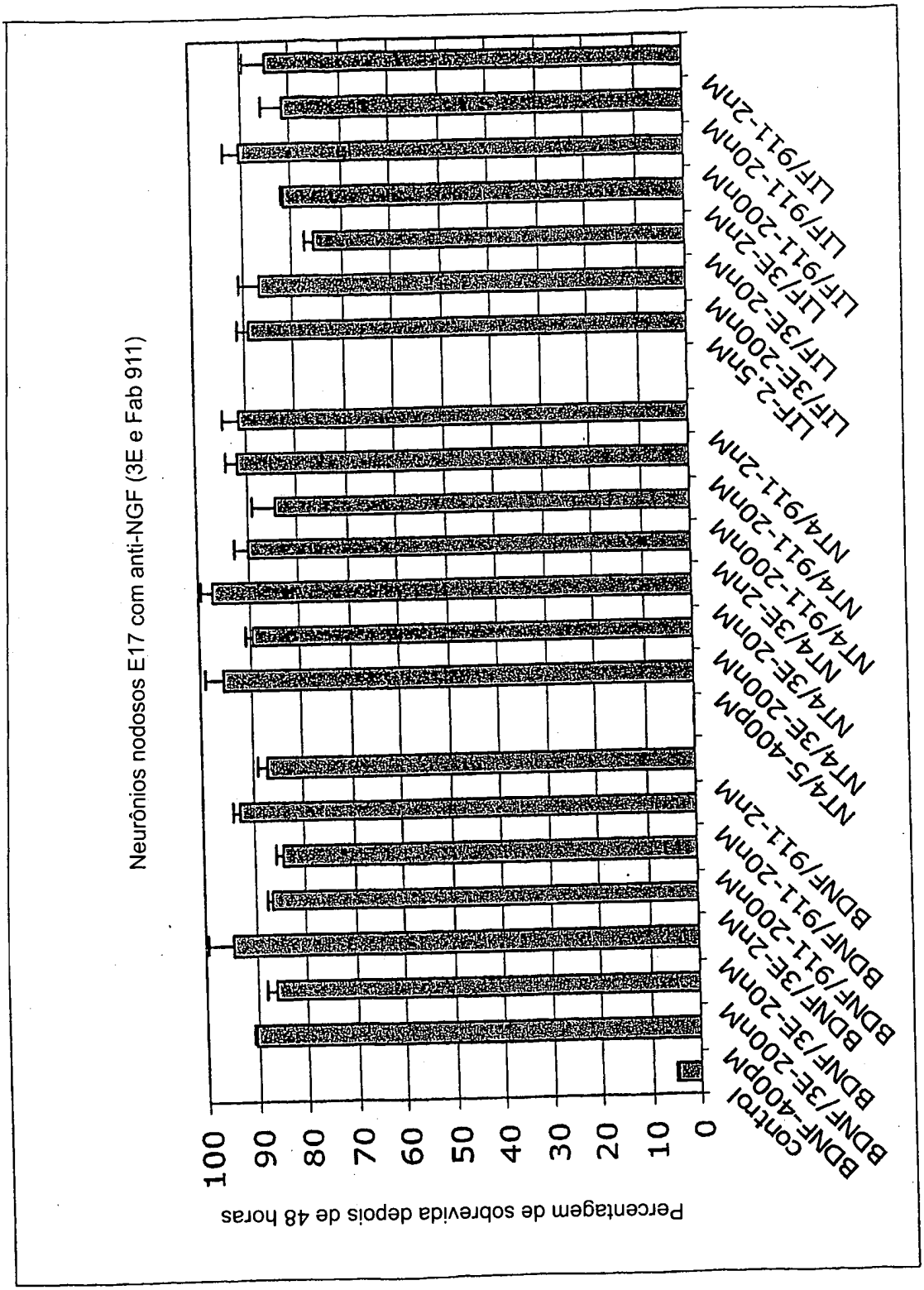

Neurônios nodosos E17 com anti-NGF (3E e Fab 911)
Percentagem de sobrevida depois de 48 horas
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
controle
BDNF-400PM
BDNF/3E-200M
BDNF/3E-20nM
BDNF/3E-2nM
BDNF/911-200nM
BDNF/911-20nM
BDNF/911-2nM
NT4/5-400PM
NT4/3E-200nM
NT4/3E-20nM
NT4/3E-2nM
NT4/911-200nM
NT4/911-20nM
NT4/911-2nM
LIF-2.5nM
LIF/3E-200nM
LIF/3E-20nM
LIF/3E-2nM
LIF/911-200nM
LIF/911-20nM
LIF/911-2nM

Fig. 17

FIG. 18

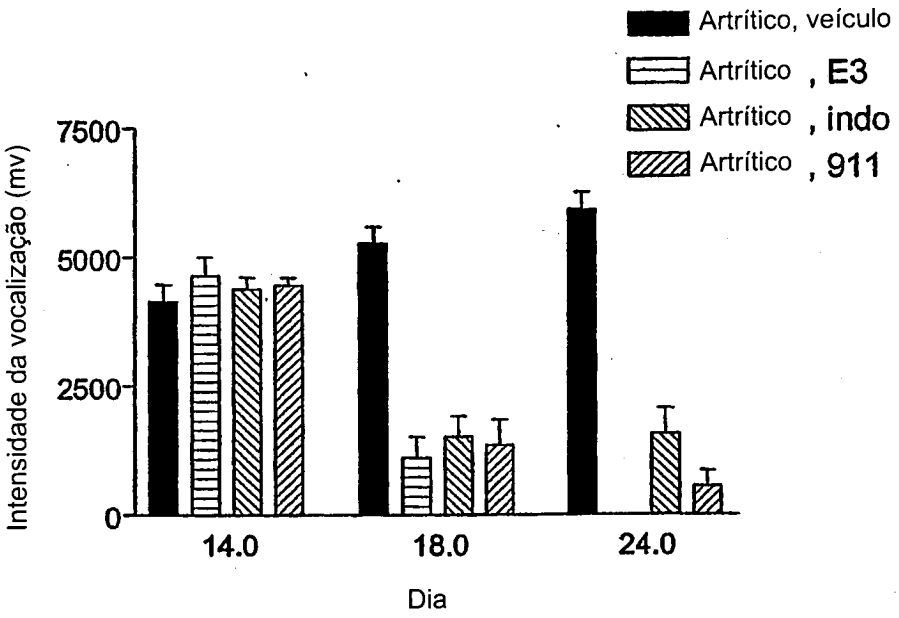

Artrítico, veículo
Artrítico , E3
Artrítico , indo
Artrítico , 911
Intensidade da vocalização (mv)
7500
5000
2500
0
14.0
18.0
24.0
Dia

FIG. 19

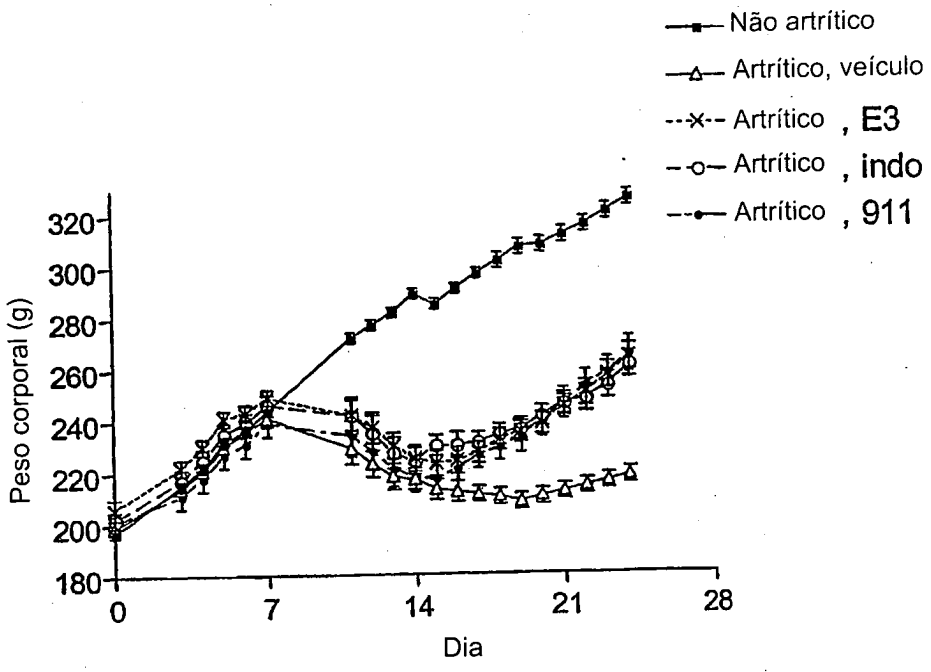

Não artrítico
Artrítico, veículo
Artrítico , E3
Artrítico , indo
Artrítico , 911
Peso corporal (g)
320
300
280
260
240
220
200
180
0
7
14
21
28
Dia

FIG. 20

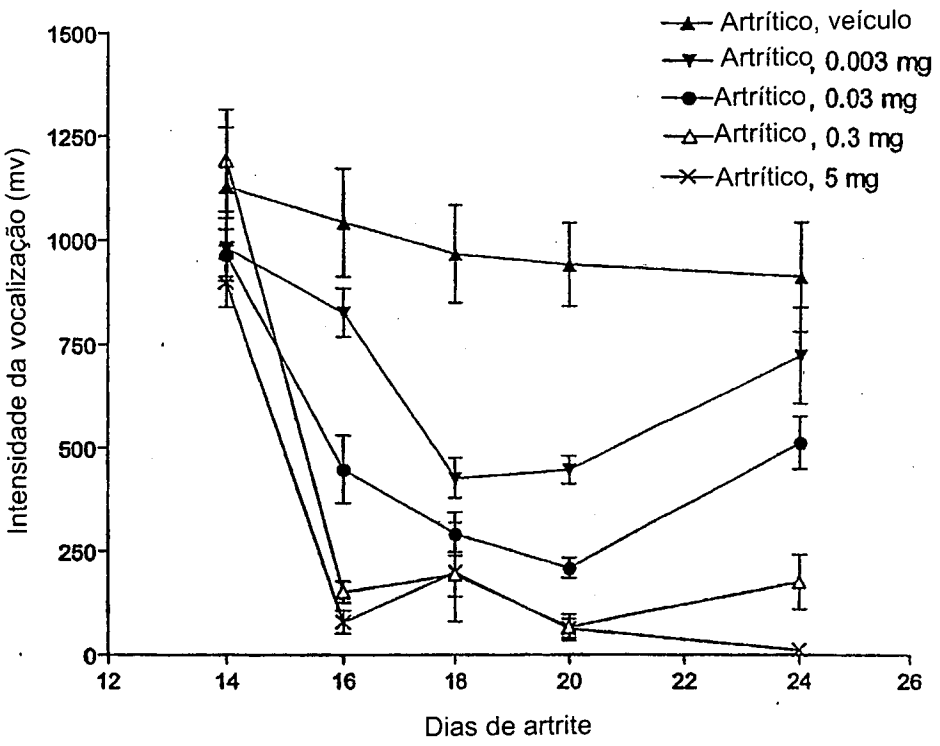

Artrítico, veículo
Artrítico, 0.003 mg
Artrítico, 0.03 mg
Artrítico, 0.3 mg
Artrítico, 5 mg
Intensidade da vocalização (mv)
1500
1250
1000
750
500
250
0
12
14
16
18
20
22
24
26
Dias de artrite

FIG. 21

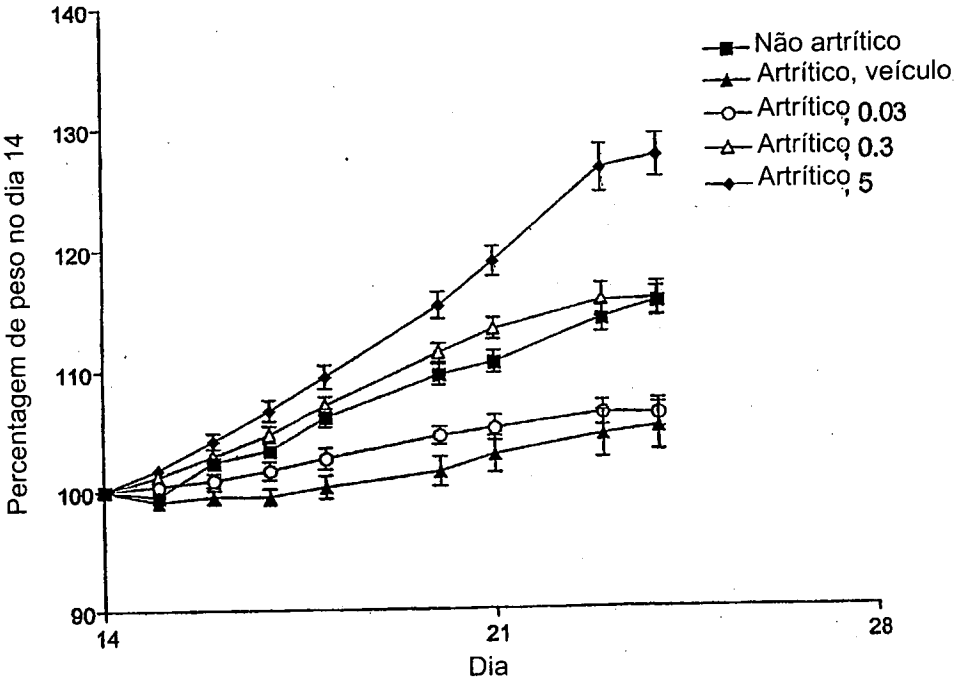

140
130
120
110
100
90
Percentagem de peso no dia 14
14
21
28
Dia
Não artrítico
Artrítico, veículo
Artrítico, 0.03
Artrítico, 0.3
Artrítico, 5

FIG. 22

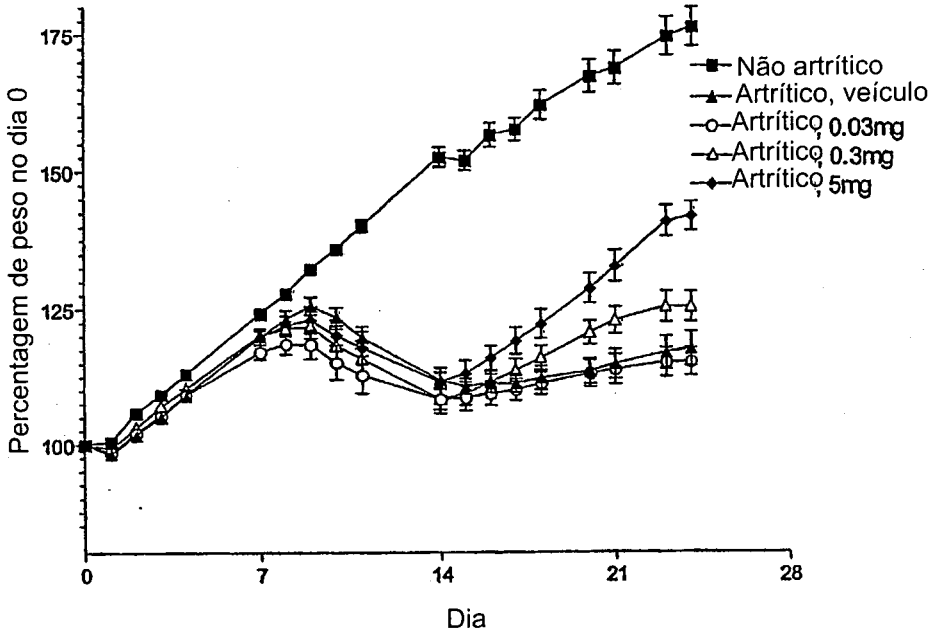

Percentagem de peso no dia 0
175
150
125
100
0
7
14
21
28
Dia
Não artrítico
Artrítico, veículo
Artrítico, 0.03mg
Artrítico, 0.3mg
Artrítico, 5mg

Fig. 23A

NUMERAÇÃO DE DOMÍNIO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA 3E

A-NUMERAÇÃO SEQÜENCIAL DE PROTEÍNA

B-NUMERAÇÃO DE KABAT

C-NUMERAÇÃO DE CHOTHIA

BOXES: CDR COMO KABAT, SUBLINHADO = CDR COMO CHOTHIA

A-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
B-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
C-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K

14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G

H1

27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
F	S	L	I	G	Y	D	L	N	W	I	R	Q

40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	I	I	W

H2

53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	V	K	S

66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
R	V	T	I	S	K	D	T	S	K	N	Q	F

79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88
79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88
S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A

Fig. 23A (continuação)

									H3			
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A
V	Y	Y	C	A	R	G	G	Y	W	Y	A	T

105	106	107	108	109	109	110	111	112	113	114	115	116
100B	100C	100D	100E	101	102	103	104	105	106	107	108	109
100B	100C	100D	100E	101	102	103	104	105	106	107	108	109
S	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V

117	118	119
110	111	112
110	111	112
T	V	S

Fig. 23B

NUMERAÇÃO DE DOMÍNIO VARIÁVEL DE CADEIA LEVE 3E
A-NUMERAÇÃO SEQÜENCIAL DE PROTEÍNA
B-NUMERAÇÃO DE KABAT
C-NUMERAÇÃO DE CHOTHIA

BOXES: CDR COMO KABAT, SUBLINHADO = CDR COMO CHOTHIA

A-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
B-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
C-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	
												L1	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	27
28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39		
Q	S	I	S	N	N	L	N	W	Y	Q	Q	K	
											L2		
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	Y	T	S	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
R	F	H	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	66
67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78		
G	S	G	T	D	F	T	F	T	I	S	S	L	
												L3	
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
Q	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C	Q	Q	E	
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	
H	T	L	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	

Fig. 23B (continuação)

105	106	107	108	109
105	106	106A	107	108
105	106	106A	107	108
E	I	K	R	T

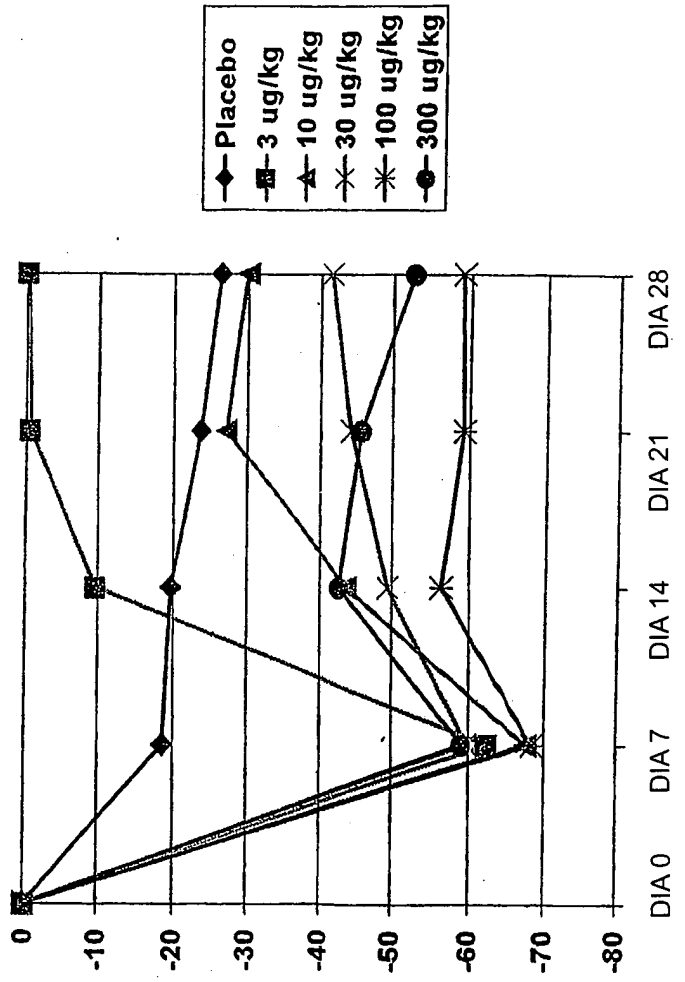

Placebo
3 ug/kg
10 ug/kg
30 ug/kg
100 ug/kg
300 ug/kg
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
DIA 0
DIA 7
DIA 14
DIA 21
DIA 28

Fig. 24

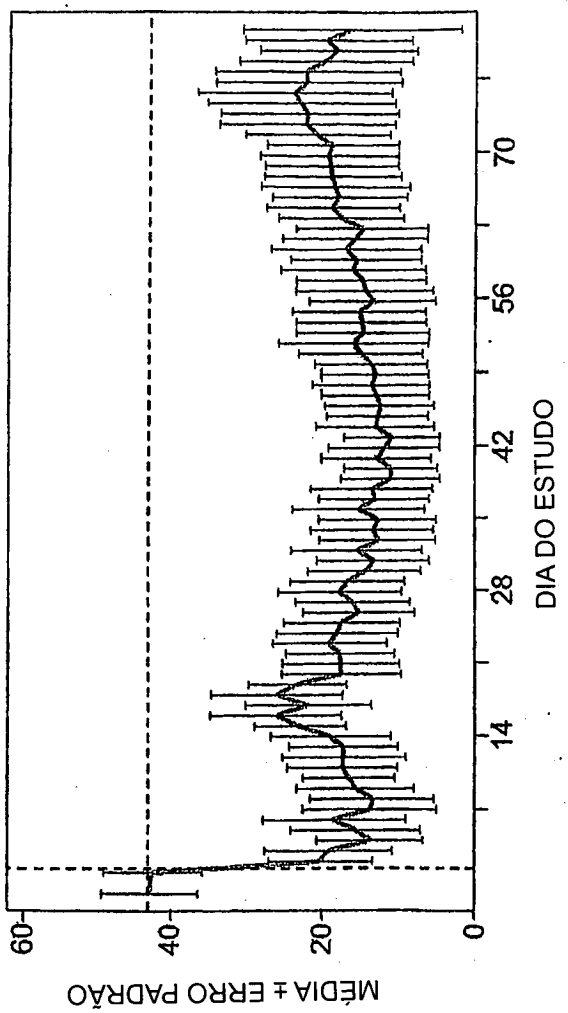


Fig. 25

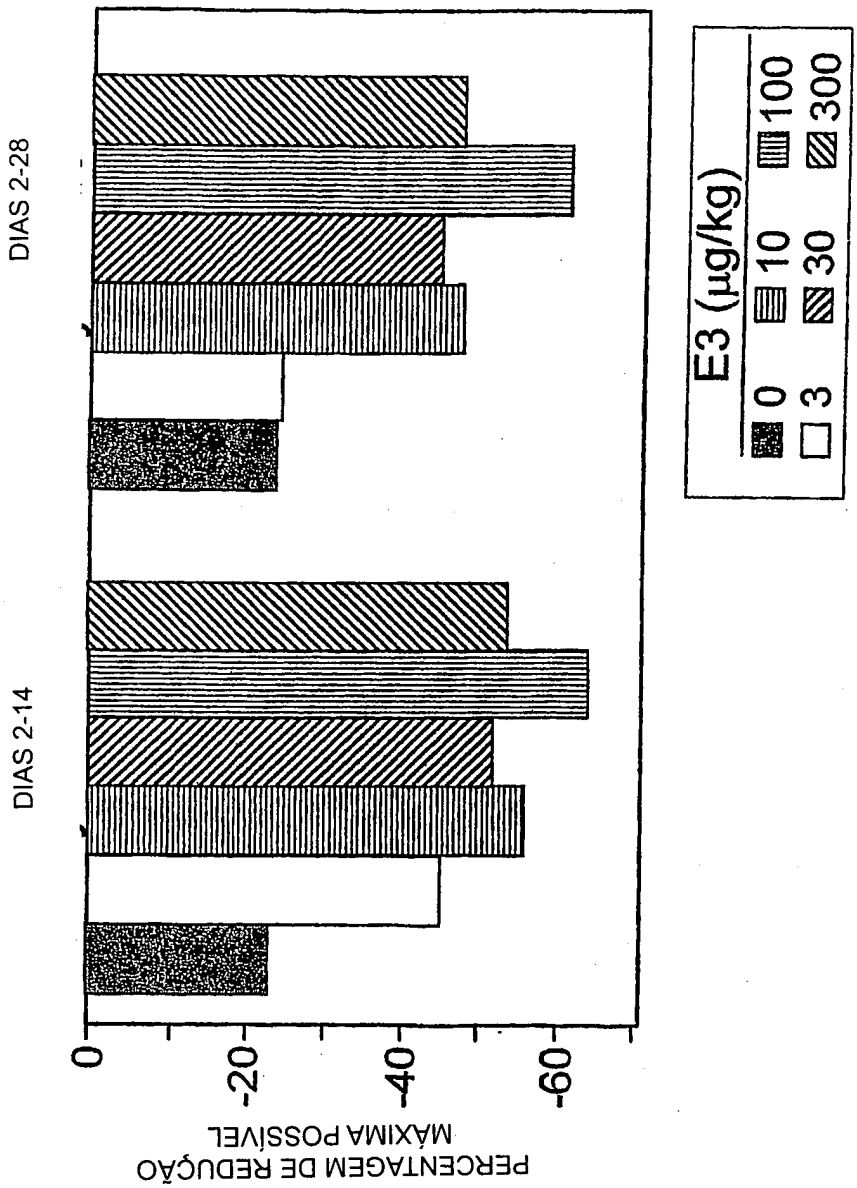

PERCENTAGEM DE REDUÇÃO
MÁXIMA POSSÍVEL
0
-20
-40
-60
DIAS 2-14
DIAS 2-28
E3 (µg/kg)
0
3
10
30
100
300

Fig. 26

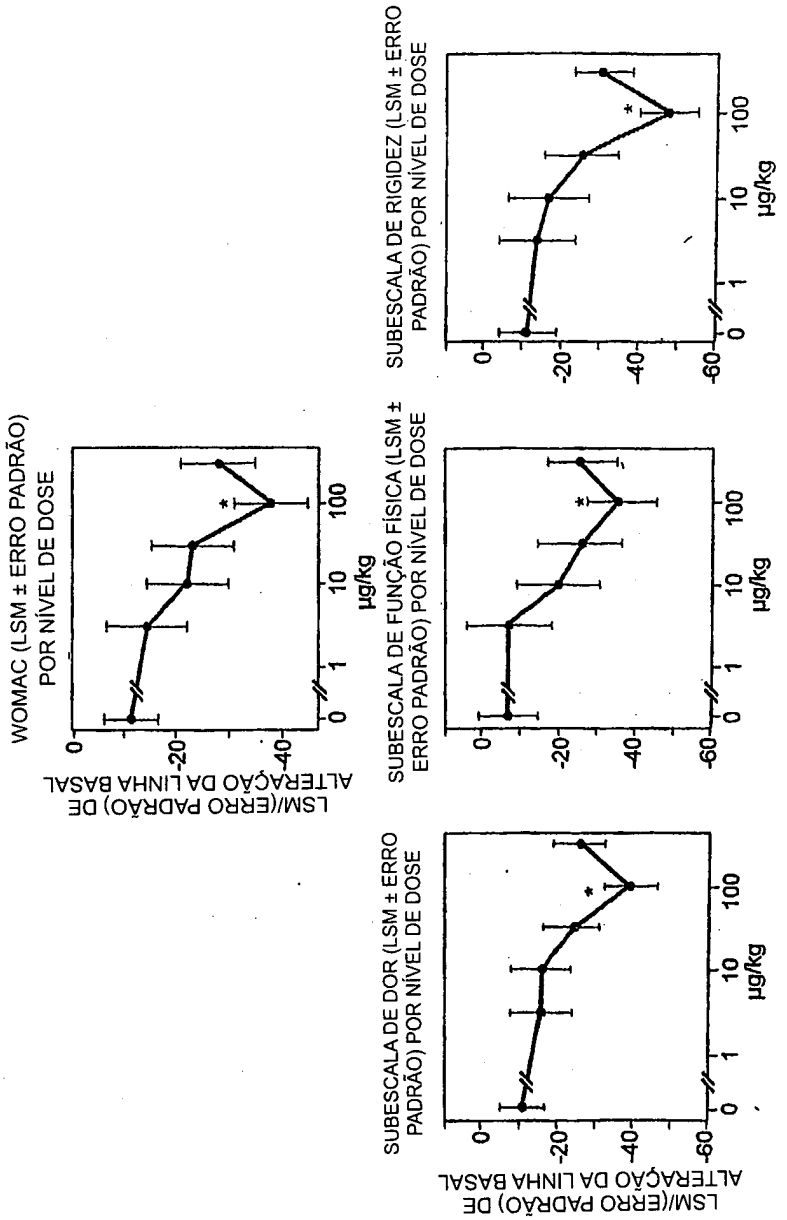

WOMAC (LSM ± ERRO PADRÃO) POR NÍVEL DE DOSE
LSM/(ERRO PADRÃO) DE ALTERAÇÃO DA LINHA BASAL
0
-20
-40
0
1
10
100
µg/kg
SUBESCALA DE DOR (LSM ± ERRO PADRÃO) POR NÍVEL DE DOSE
SUBESCALA DE FUNÇÃO FÍSICA (LSM ± ERRO PADRÃO) POR NÍVEL DE DOSE
SUBESCALA DE RIGIDEZ (LSM ± ERRO PADRÃO) POR NÍVEL DE DOSE
-60

Fig. 27

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA TRATAR DOR DE OSTEOARTRITE ADMINISTRANDO UM ANTAGONISTA DE FATOR DE CRESCIMENTO NERVOSO E COMPOSIÇÕES CONTENDO O MESMO".**

A presente invenção refere-se a anticorpos anti-NGF (tais como anticorpos anti-NGF antagonistas), e polinucleotídeos codificando os mesmos. A invenção adicionalmente refere-se ao uso de semelhantes anticorpos e/ou polinucleotídeos no tratamento e/ou prevenção de dor, inclusive dor pós-cirúrgica, dor da artrite reumatóide, e dor de osteoartrite.

PI 0610463-0
PET: 020080112891

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USOS DE UM ANTAGONISTA DE NGF E KITS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO O MESMO".**

REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício de prioridade do pedido de patente dos Estados Unidos Serial No. 11/104.248, arquivado em 11 de abril de 2005, o qual é incorporado aqui, a este pedido de patente, por meio de referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a anticorpos anti-NGF (tais como anticorpos antagonistas anti-NGF). A invenção adicionalmente refere-se ao uso de antagonistas tais como anticorpos no tratamento e/ou prevenção de dor, inclusive dor pós-cirúrgica, dor da artrite reumatóide, e dor de osteoartrite.

ANTECENTES DA INVENÇÃO

O fator de crescimento nervoso (NGF) foi a primeira neurotrofina a ser identificada, e sua função no desenvolvimento e sobrevida tanto dos neurônios periféricos quanto centrais foi bem caracterizado. Foi demonstrado que o NGF é um fator crucial de sobrevida e manutenção no desenvolvimento de neurônios periféricos simpáticos e embrionários sensoriais e de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal. Smeyne et al., *Nature* 368:246-249 (1994) e Crowley et al., *Cell* 76:1001-1011 (1994). O fator de crescimento nervoso regula para cima a expressão de neuropeptídeos em neurônios sensoriais (Lindsay and Harmer, *Nature* 337:362-364 (1989)) e sua atividade é mediada através de dois receptores ligados a membrana diferentes, o receptor de tirosina quinase TrkA e o receptor de neurotrofina comum p75 (algumas denominados receptores de NGF "de alta afinidade" e "de baixa afinidade", respectivamente). Chao et al., *Science* 232:518-521 (1986). O receptor p75 é estruturalmente relacionado o outros membros da família de receptores do fator de necrose tumoral (Chao, et al., *Science* 232:518-521 (1986)). Para revisão sobre NGF, veja Huang et al., *Annu. Rev.*

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um antagonista de NGF, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para tratar dor de osteoartrite em um indivíduo, em necessidade do mesmo.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o antagonista de NGF é um anticorpo antagonista anti-NGF.

4. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma freqüência de dosagem na faixa de uma vez a cada semana até uma vez a cada doze semanas.

5. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, uma vez a cada quatro meses, uma vez a cada cinco meses, ou uma vez a cada seis meses.

6. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada três meses.

7. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a dor é aliviada por uma duração de no mínimo cerca de sete dias depois da administração de uma única dose do anticorpo antagonista anti-NGF.

8. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a dor é aliviada por uma duração de no mínimo cerca de quatorze dias depois da administração de uma única dose do anticorpo antagonista anti-NGF.

9. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a dor é aliviada por uma duração de no mínimo cerca de quatro semanas depois da administração de uma única dose do anticorpo antagonista anti-NGF.

10. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a dor é aliviada por uma duração de no mínimo cerca de doze semanas depois da administração de uma única dose do anticorpo antagonista anti-NGF.

11. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose na faixa de cerca de 3 µg/kg até cerca de 1 mg/kg.

12. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose de cerca de 100 µg/kg.

13. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose de cerca de 300 µg/kg.

14. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado por via intravenosa.

15. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado por via subcutânea.

16. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo monoclonal.

17. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo humanizado.

18. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF liga NGF humano.

19. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF adicionalmente liga NGF de roedor.

20. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF:

(a) liga NGF com uma K_D de menos de cerca de 2 nM;

(b) inibe a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 100 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de

cerca de 15 pM de NGF humano; e

(c) inibe a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 10 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 1,5 pM de NGF.

21. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF compreende uma região variável de cadeia longa compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO: 4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO: 5.

22. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF compreende uma região variável de cadeia curta compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 6;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO: 7; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO: 8.

23. Uso de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF adicionalmente compreende uma região variável de cadeia longa compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO: 4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO: 5.

24. Uso de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos mostradas na SEQ ID NOS: 1 e 2.

25. Uso de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos mostradas na SEQ ID NOS: 16 e 17.

26. Uso de um antagonista de NGF, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para melhorar a função física em um indivíduo tendo osteoartrite, em necessidade do mes-

mo.

27. Uso de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

28. Uso de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o antagonista de NGF é um anticorpo antagonista anti-NGF.

29. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma freqüência de dosagem na faixa de uma vez a cada semana até uma vez a cada doze semanas.

30. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, uma vez a cada quatro meses, uma vez a cada cinco meses, ou uma vez a cada seis meses.

31. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada três meses.

32. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose na faixa de cerca de 3 µg/kg até cerca de 1 mg/kg.

33. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose de cerca de 100 µg/kg.

34. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose de cerca de 300 µg/kg.

35. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado por via intravenosa.

36. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado por via subcutânea.

37. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo monoclonal.

38. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo humanizado.

39. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF liga NGF humano.

40. Uso de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF adicionalmente liga NGF de roedor.

41. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF:

(a) liga NGF com uma K_D de menos de cerca de 2 nM;

(b) inibe a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 100 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 15 pM de NGF humano; e

(c) inibe a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 10 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 1,5 pM de NGF.

42. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF compreende uma região variável de cadeia longa compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO: 4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO: 5.

43. Uso de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF compreende uma região variável de cadeia curta compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 6;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO: 7; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO: 8.

44. Uso de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF adicionalmente compreende uma região variável de cadeia longa compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO: 4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO: 5.

45. Uso de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos mostradas na SEQ ID NOS: 1 e 2.

46. Uso de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos mostradas na SEQ ID NOS: 16 e 17.

47. Uso de um antagonista de NGF, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para melhorar a rigidez em um indivíduo tendo osteoartrite, em necessidade do mesmo.

48. Uso de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

49. Uso de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o antagonista de NGF é um anticorpo antagonista anti-NGF.

50. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma freqüência de dosagem na faixa de uma vez a cada semana até uma vez a cada doze semanas.

51. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, uma vez a cada quatro meses, uma vez a cada cinco meses, ou uma vez a cada seis meses.

52. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado uma vez a cada três meses.

53. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fa-

to de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose na faixa de cerca de 3 µg/kg até cerca de 1 mg/kg.

54. Uso de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose de cerca de 100 µg/kg.

55. Uso de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose de cerca de 300 µg/kg.

56. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado por via intravenosa.

57. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado por via subcutânea.

58. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo monoclonal.

59. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo humanizado.

60. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF liga NGF humano.

61. Uso de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF adicionalmente liga NGF de roedor.

62. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF:

(a) liga NGF com uma K_D de menos de cerca de 2 nM;

(b) inibe a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50 de cerca de 100 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 15 pM de NGF humano; e

(c) inibe a sobrevida dependente do fator de crescimento nervoso humano de neurônios trigeminais E13.5 de camundongo com uma IC50

de cerca de 10 pM ou menos, em que a IC50 é medida na presença de cerca de 1,5 pM de NGF.

63. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF compreende uma região variável de cadeia longa compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO: 4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO: 5.

64. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF compreende uma região variável de cadeia curta compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 6;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO: 7; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO: 8.

65. Uso de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF adicionalmente compreende uma região variável de cadeia longa compreendendo:

(a) uma região CDR1 mostrada na SEQ ID NO: 3;

(b) uma região CDR2 mostrada na SEQ ID NO: 4; e

(c) uma região CDR3 mostrada na SEQ ID NO: 5.

66. Uso de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos mostradas na SEQ ID NOS: 1 e 2.

67. Uso de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos mostradas na SEQ ID NOS: 16 e 17.

68. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF e instruções para administrar uma quantidade eficaz do antagonista de NGF a um indivíduo para tratar dor de osteoartrite no indivíduo.

69. Kit de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

70. Kit de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que o NGF-antagonista é um anticorpo antagonista anti-NGF.

71. Kit de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma freqüência de dosagem na faixa de uma vez a cada semana até uma vez a cada doze semanas.

72. Kit de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a dor é aliviada por uma duração de no mínimo cerca de sete dias depois da administração de uma única dose do anticorpo antagonista anti-NGF.

73. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF e instruções para administrar uma quantidade eficaz do antagonista de NGF a um indivíduo tendo osteoartrite para melhorar a função física no indivíduo.

74. Kit de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

75. Kit de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que o NGF-antagonista é um anticorpo antagonista anti-NGF.

76. Kit de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma freqüência de dosagem na faixa de uma vez a cada semana até uma vez a cada doze semanas.

77. Kit de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose na faixa de cerca de 3 µg/kg até cerca de 1 mg/kg.

78. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende uma quantidade eficaz de um antagonista de NGF e instruções para administrar uma quantidade eficaz do antagonista de NGF a um indivíduo tendo osteoartrite para melhorar a rigidez no indivíduo.

79. Kit de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

80. Kit de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato

de que o NGF-antagonista é um anticorpo antagonista anti-NGF.

81. Kit de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma freqüência de dosagem na faixa de uma vez a cada semana até uma vez a cada doze semanas.

82. Kit de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o anticorpo antagonista anti-NGF é administrado em uma dose na faixa de cerca de 3 µg/kg até cerca de 1 mg/kg.

83. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um antagonista de NGF e um veículo farmaceuticamente aceitável para tratar dor de osteoartrite em um indivíduo.

84. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um antagonista de NGF e um veículo farmaceuticamente aceitável para melhorar a função física em um indivíduo tendo osteoartrite.

85. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um antagonista de NGF e um veículo farmaceuticamente aceitável para melhorar a rigidez em um indivíduo tendo osteoartrite.

PI 0610463-0

RESUMO

Patente de Invenção: **"USOS DE UM ANTAGONISTA DE NGF E KITS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO O MESMO".**

A presente invenção refere-se a anticorpos anti-NGF (tais como anticorpos anti-NGF antagonistas), e polinucleotídeos codificando os mesmos. A invenção adicionalmente refere-se ao uso de semelhantes anticorpos e/ou polinucleotídeos no tratamento e/ou prevenção de dor, inclusive dor pós-cirúrgica, dor da artrite reumatóide, e dor de osteoartrite.