



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Anticorpos monoclonais na dor articular em animais de companhia

Valentin Meyer

Coimbra, junho 2023



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Anticorpos monoclonais na dor articular em animais de companhia

Coimbra, maio 2023

Valentin MEYER

Aluno do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Professora Doutora

Liliana Cristina Pereira Montezinho

Arguente: Professor Doutor Nuno Gonçalo

Ferreira Cardoso

Orientador Interno

Professor Doutor Hugo Vilhena

Coorientador Interno

Professora Doutora Anabela
Almeida

Orientador Externo

Dr. Laurent Philippe
(Vet-Union)

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço sinceramente ao meu orientador interno, o Professor Doutor Hugo Vilhena, pela sua orientação e supervisão na definição deste trabalho. Eu gostaria também de agradecer à minha coorientadora interna, a Professora Doutora Anabela Almeida, pela sua ajuda inestimável, pela sua experiência na área da imunologia e da farmacologia e pelos seus conselhos esclarecidos que muito beneficiaram a qualidade do meu trabalho.

Eu gostaria agradecer em particular ao meu orientador externo, o Dr. Laurent Phillipe, e toda a equipa da clínica veterinária de Sarre-Union, sem esquecer o Doutor Antoine Mercier, por todo o interesse demonstrado, pela paciência, pelos contributos na minha formação ao longo dos meus estudos e por toda a confiança concedida ao meu trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos aos meus amigos pelo apoio sem falhas e por essa amizade ao longo desses anos que passamos juntos. Eu agradeço também os meus colegas.

Eu sou imensamente grato à Agathe Galet pelo seu apoio infalível, a sua preciosa ajuda na realização desses estudos, a sua paciência, o seu amor e a sua compreensão. Obrigado de partilhar a minha vida.

A minha família merece uma menção especial por tornarem possível o desenvolvimento desta longa viagem, num outro país, pelo apoio incondicional, pelo incentivo, pelo amor, pela compreensão, mas sobretudo pela paciência que me permitiu realizar estes estudos.

Eu também sou grato à EUVG e à GEDS pela oportunidade que me deram de seguir este curso, e também gostaria de deixar um agradecimento aos meus professores pelo ensino, pela experiência e pelo apoio ao longo da minha formação.

Por fim, eu gostaria agradecer ainda a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização do meu curso, sem os quais não teria sido possível.

Sinceros agradecimentos a todos.

Índice geral

Agradecimentos	iv
Índice geral	v
Lista de abreviaturas	vi
Página de título	1
Resumo	2
Abstract	3
Introdução	4
I. Características dos anticorpos monoclonais	5
I.1. Definição	5
I.2. Estrutura	5
I.3. Perspetiva histórica e síntese	5
II. <i>Nerve growth factor</i>	6
II.1. Definição	6
II.2. Função do <i>nerve growth factor</i> na dor	7
II.3. Função do <i>nerve growth factor</i> na inflamação	8
III. Farmacocinética e farmacodinamia dos anticorpos monoclonais anti- <i>nerve growth factor</i>	9
III.1. Farmacocinética	9
III.1.1. Absorção	9
III.1.2. Distribuição	10
III.1.3. Metabolização	10
III.1.4. Eliminação	11
III.2. Farmacodinamia	11
IV. Perspetivas terapêuticas dos anticorpos monoclonais	11
IV.1. Eficácia analgésica dos anticorpos monoclonais anti- <i>nerve growth factor</i>	12
IV.2. Dados obtidos em modelos experimentais	12
IV.3. Ensaio clínico no cão	12
IV.4. Efeitos adversos no cão	13
IV.5. Ensaio clínico no gato	13
IV.6. Efeitos adversos no gato	14
IV.7. Ensaio clínico em humanos	14
Conclusão	15
Bibliografia	16

Lista de abreviaturas

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro
(do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*)

CBPI - *Canine brief pain inventory*

CDR - Região determinante complementar (do inglês *Complementary determining region*)

CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês *Calcitonin gene-related peptid*)

CH - Domínio constante da cadeia pesada

CHO - Ovário de hamster chinês (do inglês *Chinese hamster ovary*)

CL - Domínio constante da cadeia leve

Cmax - Concentração plasmática máxima

CSOM - *Client-specific outcome measures*.

CYP - Citocromos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

Fab - Fragmento de ligação ao antígeno (do inglês *Fragment antigen binding*)

Fc - Fragmento cristalizável

FcRn - Recetor do fragmento cristalizável neonatal (do inglês *Neonatal fragment crystallizable recetor*)

Ig - Imunoglobulina

IM - Intramuscular

IRIS - *International Renal Interest Society*

IL - Interleucina

IV - Intravenosa

LOAD - Índice canino de osteoartrite de Liverpool (do inglês *Liverpool osteoarthritis in dogs index*)

mAb - Anticorpos monoclonais

MNAC13 - Monoiodoacetato 13

NGF - Fator de crescimento neuronal (do inglês *Nerve growth factor*)

NMDA - N-metilo-D-aspartato

NT-3 - Neurotrofina 3

NT-4-5 - Neurotrofina 4/5

NV-01 - Anti-NGF recombinante canino

NV-02 - Anti-NGF recombinante felino

OMS - Organização mundial de saúde

PIS - Pontuação de interferência da dor (do inglês *Pain interference score*)

PSS - Pontuação da gravidade da dor (do inglês *Pain severity score*)

RPOA - Osteoartrite progressiva aguda (do inglês *Rapidly progressive osteoarthritis*)

SC - Subcutâneo

SP - Substância P

Tmax - Tempo para atingir a concentração máxima

TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês *Tumor necrosis factor*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral α (do inglês *Tumor necrosis factor α*)

Trk - Cinase do recetor da tropomiosina (do inglês *Tropomyosin receptor kinase*)

TrkA - Cinase do recetor da tropomiosina A

VH - Domínio variável da cadeia pesada

VL - Domínio variável da cadeia leve

Anticorpos monoclonais na dor articular em animais de companhia

Valentin Meyer ^a, Anabela Almeida ^{b, c}, Hugo Vilhena ^{b, d, e, f}

^a Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 33020-210, Coimbra, Portugal.
(valentin.meyer27@gmail.com)

^b Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 33020-210 Coimbra, Portugal (anabela.almeida@euvg.pt ; hugo.vilhena@euvg.pt)

^c Coimbra Institute for Biomedical Imaging and Translational Research (CIBIT), University of Coimbra, Edifício do ICNAS, Polo 3 Azinhaga de Santa Comba 3000-548 Coimbra, Portugal

^d Onevetgroup Hospital Veterinário Universitário de Coimbra (HVUC), Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 33020-210, Coimbra, Portugal

^e Centro de Ciência Animal e Veterinária (CECAV), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5000-801, Vila Real, Portugal

^f Laboratório Associado de Ciência Animal e Veterinária AL4AnimaLS, Faculdade de Medicina Veterinária; Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa Portugal

Resumo

A artrose é uma doença crónica degenerativa, e a gestão da dor relacionada com esta doença é um dos grandes desafios clínicos desta década em medicina humana e veterinária. Os anticorpos monoclonais, amplamente utilizados em investigação, começam a despontar na medicina pelas suas propriedades inovadoras.

Os anticorpos monoclonais anti-fator de crescimento neuronal (NGF), como o bedinvetmab e o frunevetmab, são imunoglobulinas obtidas respetivamente pela técnica de "*single B cell*" em cães e "PETização" em gatos, técnicas que visam aumentar a especificidade dos anticorpos em relação às espécies alvos, a fim de limitar a resposta de imunogenicidade induzida.

As propriedades de farmacocinética e farmacodinamia dos anticorpos monoclonais são complexos e ainda pouco conhecidos, e diferem muito de outras terapias convencionais e de largo espectro atualmente utilizadas. A utilização dos anticorpos monoclonais anti-NGF no tratamento da dor crónica associada à artrose em animais de companhia tem mostrado resultados muito promissores, permitindo associar uma eficácia analgésica a longo prazo (cerca de quatro semanas) após uma única administração subcutânea, uma especificidade de ação elevada e uma elevada inocuidade relacionada na sua eliminação.

O objetivo dos anticorpos monoclonais anti-NGF é inibir a ação do NGF, um dos principais fatores responsáveis pela neuroplasticidade associada à dor osteoarticular crónica. O NGF atua na via da dor e amplifica os mecanismos de hipersensibilização periférica e central. Os anticorpos monoclonais anti-NGF impedem a ligação do NGF ao domínio cinase do recetor da tropomiosina A (TrkA), limitando os sinais de dor.

Os ensaios clínicos duplos-cegos randomizados realizados em cães e gatos demonstraram uma eficácia analgésica em vários casos de artrose. Os efeitos adversos severos documentados em humanos relativos ao desenvolvimento de uma artrose destrutiva aguda e de distúrbios neurológicos não foram descritos até o momento no cão e no gato, e os vários ensaios clínicos parecem confirmar a segurança dos anticorpos monoclonais anti-NGF nos animais de companhia.

Palavra-chave: anticorpos monoclonais, anti-NGF, artrose, bedinvetmab, dor, frunevetmab.

Abstract

Osteoarthritis is a chronic degenerative disease, and pain management related to this disease is one of the great clinical challenges of this decade in human and veterinary medicine. Monoclonal antibodies, widely used in research, are beginning to emerge in medicine for their innovative properties.

Anti-nerve growth factor (NGF) monoclonal antibodies, such as bedinvetmab and frunevetmab, are immunoglobulins obtained respectively by the "single B cell" technique in dogs and "PETization" in cats, techniques that aim to increase the specificity of antibodies in relation to target species in order to limit the induced immunogenicity response.

Pharmacokinetics and pharmacodynamics properties of monoclonal antibodies is complex and remains largely unknown, and differ greatly from other conventional and broad-spectrum therapies currently in use in companion animals. The use of anti-NGF monoclonal antibodies in the treatment of chronic pain associated with arthrosis has shown promising results, allowing the association of long-term analgesic efficacy (about four weeks) after a single subcutaneous administration, high specificity of action and high harmlessness related to its disposal.

The objective of the monoclonal antibodies anti-NGF is to inhibit NGF, one of the main factors responsible for the neuroplasticity associated with chronic osteoarticular pain. Nerve growth factor acts on the pain pathway and amplifies peripheral and central hypersensitization mechanisms. Anti-NGF monoclonal antibodies prevent NGF from binding to tropomyosin receptor kinase domain A (TrkA), limiting pain signals.

Randomized double-blind clinical trials performed in dogs and cats have demonstrated analgesic efficacy in several cases of osteoarthritis. Severe adverse effects documented in humans relating to the development of rapid destructive arthrosis and neurological disorders have not been described so far in dogs and cats, and the various clinical trials seem to confirm the safety of anti-NGF monoclonal antibodies in companion animals.

Keywords: anti-NGF, bedinvetmab, frunevetmab, monoclonal antibodies, osteoarthritis, pain.

Introdução

A artrose, também conhecida como osteoartrite, corresponde a uma doença articular degenerativa crônica, que provoca dor crônica e alterações em toda a articulação, incluindo a cartilagem, a sinóvia, o osso subcondral e as regiões adjacentes da articulação (Enomoto et al., 2019). Pode ser devida a um distúrbio do desenvolvimento, e iniciar-se nos primeiros anos de vida do animal, mas é mais frequentemente devida a fatores de riscos que desempenham um papel no seu desenvolvimento, incluindo a dieta, a genética, o ambiente, a obesidade e a idade (Enomoto et al., 2019). Durante muito tempo pensou-se que a artrose era simplesmente uma doença de desgaste causada pela sobrecarga crônica e alterações na biomecânica da articulação, que originavam destruição da cartilagem articular e inflamação associada. Atualmente reconhece-se que a artrose é um processo mais complexo que envolve fatores inflamatórios e metabólicos (Abramoff & Caldera, 2020). Clinicamente, o quadro clínico é caracterizado por dor, sensibilidade, crepitação, rigidez, tumefação e limitação dos movimentos articulares com diferentes graus de inflamação local (Pereira et al., 2015; Abramoff & Caldera, 2020), afetando mais de 20% dos cães com mais de um ano de idade e 80% dos cães geriátricos (Tellegen et al., 2019). Mais de 90% dos gatos com mais de 12 anos apresentam alterações radiográficas compatíveis com uma doença articular degenerativa (Epstein, 2019).

A utilização clínica dos anticorpos monoclonais anti-*nerve growth factor* (NGF) surgiu em 2021, apresentando uma nova modalidade terapêutica direcionada para o alívio da dor devida a artrose em animais de companhia. O frunevetmab e o bedinvetmab, anticorpos monoclonais anti-NGF, respetivamente para gatos e cães, têm propriedades e efeitos inovadores, uma elevada eficácia analgésica (Lascelles et al., 2015) e uma elevada segurança farmacológica (Shepard et al., 2017). Devido a estas características, tornam-se muito úteis em casos de multimorbilidades.

O presente trabalho teve como principal objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre a utilização de anticorpos monoclonais anti-NGF como alternativa terapêutica no âmbito da abordagem da dor provocada por osteoartrite no cão e no gato, tendo em consideração os resultados obtidos em diferentes estudos clínicos.

I. Características dos anticorpos monoclonais

I.1. Definição

Os anticorpos monoclonais (mAb) são imunoglobulinas produzidas por células que foram selecionadas e cultivadas pela sua capacidade de produzir um anticorpo específico. Este anticorpo específico é obtido inicialmente pela exposição de células imunes estritamente idênticas (um clone celular), a uma proteína-alvo contra a qual esse clone vai produzir o anticorpo esperado (Nelson et al., 2000).

Assim, o anticorpo monoclonal é específico para um único epítopo de um alvo antigénico que se liga especificamente a moléculas que apresentam o epítopo alvo, para os identificar, neutralizar ou bloquear. Mais especificamente, as sequências de aminoácidos de uma imunoglobulina são inicialmente produzidas por células criadas *in vitro* designadas hibridomas, geralmente a partir de genes que codificam uma imunoglobulina de um plasmócito. Posteriormente são recombinados por tecnologia do ácido desoxirribonucleico (DNA) recombinante usando sistemas de expressão de células de mamíferos, nomeadamente um sistema celular designado ovário de hamster chinês (CHO) (McDonnell, 2015; Posner et al., 2019).

I.2. Estrutura

Os anticorpos são formados por quatro cadeias polipeptídicas, que se organizam numa estrutura em “Y”. Existem duas cadeias leves, constituídas por um domínio constante (CL) e um domínio variável (VL). As duas cadeias pesadas têm um domínio variável N-terminal (VH) e três ou quatro domínios constantes (CH), estes últimos são localizados nas extremidades dos dois braços e constituem o sítio de reconhecimento do antígeno, denominado região do fragmento de ligação do antígeno (Fab). O Fab apresenta elevada especificidade com o antígeno alvo, quer sejam citocinas, proteínas ou imunoglobulinas. A parte constante representada pela base do Y que é comum a cada tipo de anticorpos e contém a região do fragmento cristalizável (Fc), cujas funções incluem a ativação do complemento, o catabolismo dos anticorpos, a passagem placentária das Imunoglobulinas (Ig) G e a ligação aos recetores do Fc facilitando a fagocitose ou a lise celular pelas células imunitárias (Murphy K. Janeway's, 2015).

I.3. Perspetiva histórica e síntese

Historicamente, a técnica de produção de mAb foi desenvolvida por Georges Köhler e Cesar Milstein em 1975, e ficou conhecida por técnica de hibridoma, em resultado da fusão de linfócitos B com células de mieloma linfóide humano que tem uma capacidade de multiplicação rápida e indefinida em meio de cultura (Shepard et al., 2017). A primeira geração de mAb apresentava algumas limitações,

nomeadamente a sua semi-vida curta, ligação fraca aos recetores Fc humanos e o aparecimento de anticorpos anti-anticorpos de rato (Bellet et al., 2008).

As técnicas de quimerização utilizando a recombinação do ADN permitiram, gradualmente, a “humanização” parcial dos mAb murinos, nos quais as regiões constantes das cadeias pesadas e leves das imunoglobulinas murinas foram substituídas por regiões constantes humanas (Morrison et al., 1984). Já foram produzidos mAb totalmente humanos, por fermentação microbiana ou pela técnica dos ratos transgénicos chamada “*XenoMouse*”, envolvendo ratos que têm sequências próprias de ADN e genes adicionais ou modificados (transgenes). Esses genes foram adicionados ao património hereditário dos ratos e expressaram a grande maioria dos genes que codificam as imunoglobulinas humanas (Bellet et al., 2008).

Atualmente, o anticorpo monoclonal bedinvetmab é produzido pelo processo de “*single B cell*” a partir de um único linfócito B através de técnicas de ADN recombinantes. A imunização do cão dador de linfócitos B é promovida pela inoculação de NGF conjugado a uma anatoxina diftérica, permitindo que o anticorpo monoclonal do cão seja recombinado nas células CHO (EMA, 2021^a). O frunevetmab é um anticorpo monoclonal felino obtido pela técnica de “PETização” que corresponde a um transplante da região determinante complementar (CDR) do anticorpo que é posteriormente recombinada em CHO (EMA, 2021^b).

II. **Nerve growth factor**

II.1. Definição

O NGF faz parte de uma família de fatores neurotróficos (neurotrofinas), que inclui também o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina 3 (NT-3) e a neurotrofina 4/5 (NT- 4-5) (Rocco et al., 2018). Estas neurotrofinas estão principalmente envolvidos no crescimento, diferenciação e sobrevivência neuronal sensorial e simpática (Enomoto et al., 2019).

Existem 2 tipos de recetores aos quais as neurotrofinas se podem ligar, a cinase do recetor da tropomiosina (Trk) com alta afinidade e o recetor p75, membro da superfamília de recetores do fator de necrose tumoral (TNF), com baixa afinidade (Denk et al., 2017).

O NGF desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário, pois estimula o desenvolvimento dos neurónios sensoriais e a diferenciação do sistema simpático. Em ratos, os neurónios sensoriais nociceptivos são dependentes do NGF para sobreviver até uma a duas semanas após o nascimento. O NGF não é essencial para a sobrevivência neuronal na idade adulta, mas desempenha um importante papel trófico na homeostase, neo-inervação e plasticidade neuronal (Denk et al., 2017; Nicol & Vasko, 2007). É sintetizado e secretado principalmente em processos inflamatórios

por células neuronais, células estruturais como fibroblastos, células epiteliais, adipócitos e células musculares lisas (Freund-Michel & Frossard, 2008).

II.2. Função do *nerve growth factor* na dor

Além de ter um papel importante como fator de crescimento neuronal, o NGF é um mediador com funções determinantes na dor aguda e crônica. Primeiramente, o NGF tem um papel na sensibilização periférica, quer seja imediata ou retardada, e é sintetizado e libertado pelos tecidos periféricos em resposta a estímulos nódicos. Nenhum dos recetores neurotróficos é conhecido por estar ligado diretamente a uma corrente iónica excitatória, contudo o NGF consegue estimular estes canais. Através da ligação aos recetores TrkA na superfície dos neurónios sensoriais o NGF vai ativar diferentes vias de sinalização intracelular que geram uma sensibilização periférica rápida e uma hiperexcitabilidade dos canais iónicos dependentes de voltagem (Hoheisel et al., 2005; Zhuang et al., 2004).

A sensibilização periférica retardada é realizada através da incorporação do complexo NGF/TrkA em vesículas que se vão dirigir por via retrógrada para os corpos celulares dos neurónios nociceptivos presentes nos gânglios da raiz dorsal da medula espinhal. Assim, o complexo vai exercer um controlo transcricional de vários genes sobre esses neurónios, ativando diversas cascatas de sinalização intracelular que influenciam a sensibilidade dos nociceptores e potenciam a produção dos principais recetores e canais envolvidos no processo da dor (Pezet & McMahon, 2006). Mais precisamente, essa ativação vai modular e/ou aumentar a expressão de vários recetores da superfície celular e dos canais iónicos envolvidos na nocicepção (o recetor vanilóide de potencial transitório 1, os canais iónicos sensíveis a ácidos, os recetores da bradicinina, os canais de sódio e cálcio dependentes da voltagem e os mecanotransdutores). A sinalização de NGF/TrkA também origina alterações transcripcionais causando aumento na expressão de neurotransmissores pró-nociceptivos (substância P (SP), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e BDNF), originando alterações funcionais e fenotípicas na fibra aferente primária (Enomoto et al., 2019).

A estrutura em T dos neurónios primários vai dirigir os neuropeptídeos para dois locais diferentes, aplicando assim dois tipos de condução. Primeiro, eles podem ir para a extremidade periférica dos terminais livres dos neurónios, originando uma condução antidrómica, responsável pela inflamação neurogénica. O arco reflexo utiliza as vias aferentes e eferentes para a extensão da área dolorosa, combinando ações vasodilatadoras, a desgranulação dos mastócitos e a permeabilidade vascular (Priestley et al., 2002). Podem também dirigir-se para o corno dorsal da medula espinhal, aumentando assim a transmissão sináptica dos impulsos nervosos, designada de condução ortodrómica. Por esta via também vai atuar na manutenção da sensibilização central (Hoheisel et al., 2005b).

Além da sensibilização de vias periféricas, o NGF tem um papel importante na sensibilização central retardada. O aumento da libertação sináptica dos neurotransmissores excitatórios induz a abertura dos canais N-metil-D-aspartato (NMDA), participando na sensibilização central retardada e levando ao

aparecimento de sinais clínicos como a hiperalgesia, a alodinia e a hiperpatia. A hiperalgesia térmica induzida pelo NGF tem uma instalação e restauração rápida, em alguns minutos, ao contrário da hiperalgesia e da alodinia mecânica que têm uma instalação mais gradual. Os distintos mecanismos de hipersensibilidade ainda não estão claramente elucidados, mas o desenvolvimento espacial e temporal da hipersensibilidade mecânica e térmica induzida pelo NGF parece ser dependente do local, da via de injeção e da espécie examinadas (Mills et al., 2013).

II.3. Função do *nerve growth factor* na inflamação

Existe uma estreita relação entre o processo inflamatório e a dor, nomeadamente quando falamos de inflamação sinovial crónica. Diferentes células inflamatórias são capazes de sintetizar e libertar o NGF, como os linfócitos T e B, os basófilos, os eosinófilos, os mastócitos e os macrófagos (Nilsson et al., 1997; Ricci et al., 2000). O NGF promove a diferenciação dos monócitos em macrófagos, estimula a diferenciação, a sobrevivência e a desgranulação dos mastócitos, libertando rapidamente citocinas tal como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a histamina e a serotonina (mediadores dos mastócitos). As interleucinas e os leucotrienos são libertados mais tarde, algumas horas depois. Existe também uma correlação entre a concentração de NGF nas articulações artríticas e a densidade de mastócitos presentes (Fusco et al., 2017).

A etiopatogenia da artrose é complexa, multifatorial e não é devida exclusivamente à componente inflamatória e à degradação da cartilagem. As metaloproteases e as agreganases são libertadas em consequência dos microtraumas articulares sofridos pela cartilagem, o osso subcondral e as bolsas adiposas articulares, causando alterações na matriz extracartilaginosa. A imunidade inata provoca respostas de reparação não adaptadas pelas vias pró-inflamatórias, ativando os macrófagos e os mastócitos sinoviais. Assim, a inflamação sinovial crónica de baixa intensidade é mediada pelas interleucinas (IL) IL-1b, IL-6 e TNF α (Q. Wang et al., 2019).

Existe também um componente inflamatório neurogénico envolvendo os neuropeptídeos SP e o CGRP. A proliferação dos queratinócitos causa um excesso de síntese de NGF. A libertação da SP, CGRP e histamina induz uma vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. A neuroquinina A induz a contração das fibras musculares lisas de diferentes órgãos e dos vasos sanguíneos (Sorkin et al., 2018).

O NGF é um mediador periférico fortemente envolvido na hiperalgesia primária e secundária induzida por inflamação periférica e neurogénica. O aumento da concentração de NGF no líquido sinovial e do recetor TrkA na membrana sinovial tem sido descrito em modelos animais de artrite inflamatória por meio da indução pela carragenina e da indução pelo adjuvante de Freund (Aloe et al., 1992; Ångeby Möller et al., 2015; Wu et al., 2000). Em humanos, muitas condições patológicas associadas à dor crónica apresentam níveis aumentados de NGF, incluindo a cistite intersticial, a prostatite, a pancreatite, a artrite, a artrose, a dor oncológica, a enxaqueca, a neuropatia diabética e a dor pós-operatória

(Minnone et al., 2017). Concentrações muito altas de NGF são encontradas principalmente em doentes com artrose do joelho, variando assim de acordo com a gravidade da doença (Montagnoli et al., 2017).

Encontramos uma estreita relação entre a variação nas concentrações de NGF e a alteração morfológica dos condrócitos combinada com a perda da integridade da cartilagem (Stoppiello et al., 2014). Um estudo de 2011 (Isola et al., 2011) demonstrou pela primeira vez a presença de NGF no líquido sinovial do cão e mais precisamente um aumento da sua concentração em cães com claudicação crónica, em comparação com cães saudáveis e outros com claudicação aguda, sugerindo que o NGF esteja envolvido na inflamação osteoartrítica e na dor crónica.

III. Farmacocinética e farmacodinamia dos anticorpos monoclonais anti-nerve growth factor

A ação farmacocinética (ação do organismo sobre a substância ativa) e farmacodinamia (ação da substância ativa no organismo) dos mAb difere dos outros fármacos pela especificidade da sua estrutura molecular. Além disso, a farmacocinética dos mAb não passa pelas vias clássicas que consistem em metabolismo hepático e excreção renal. De facto, isso é caracterizado por um catabolismo proteolítico não específico e uma eliminação dependente da ligação ao antígeno alvo (Paintaud, 2009).

III.1. Farmacocinética

O comportamento dos mAb seguindo as diferentes etapas farmacocinéticas não é semelhante ao dos outros fármacos. O destino dos mAb no corpo e a relação entre a concentração e o efeito *in vivo* ainda são pouco conhecidos. Os dados sobre sua farmacocinética são, portanto, insuficientemente utilizados e a escolha da dose terapêutica a ser administrada é difícil de precisar.

III.1.1. Absorção

A via oral não está indicada em virtude do elevado peso molecular, a polaridade, a permeabilidade limitada da membrana e a baixa estabilidade gastrointestinal dos mAb. A biodisponibilidade oral dos mAb é muito baixa (<1%). Portanto, a administração parenteral ocorrerá preferencialmente por via intravenosa (IV), intramuscular (IM) e subcutâneo (SC) (Castelli et al., 2019)

O resumo das características do medicamento do bedinvetmab refere que a concentração plasmática máxima (C_{max}), no valor de de 6,1 µg/ml, é atingida entre 2 e 7 dias após uma injeção SC duma dose de 0,5 a 1 mg/kg. A biodisponibilidade é de aproximadamente 84% em comparação com administração IV, a meia-vida de eliminação de aproximadamente 12 dias e a área média sob a curva de 141 µg/ml por dia. Num estudo de laboratório de 6 meses com cães beagles adultos saudáveis que receberam bedinvetmab em cada 28 dias em doses compreendidas entre 1 a 10 mg/kg SC, a área sob a curva

(AUC) e a Cmax aumentaram quase proporcionalmente com a dose e o estado de equilíbrio foi alcançado após aproximadamente 2 doses (EMA Librelva, 2021-a).

O resumo das características do medicamento para o frunevetmab refere que a Cmax do fármaco foi observada após 3 a 7 dias (Tmax médio de 6,2 dias) e a biodisponibilidade foi de cerca de 60%. Num estudo de laboratório de 6 meses, os gatos adultos saudáveis receberam frunevetmab em cada 28 dias em doses variando de 2,8 a 14 mg/kg SC. A AUC e a Cmax aumentaram ligeiramente, embora sem que se verifique relação proporcional com a dose (EMA Solensia, 2021-b).

Após a administração SC, os mAb maiores que 16 KDa são principalmente absorvidos pelo sistema linfático, enquanto que os de tamanho inferior a 2 KDa são principalmente absorvidos pelo sistema sanguíneo. A absorção dos mAb é um processo lento, com picos de concentração compreendidos entre 5 a 10 dias após a administração e a fração absorvida representa em média 50 a 100% da dose administrada. Uma das desvantagens de usar a via SC ou IM é a variabilidade farmacocinética associada à absorção. (Paintaud, 2009).

III.1.2. Distribuição

Os mAb, devido ao seu grande tamanho e o seu carácter hidrofílico, têm pouca capacidade de penetrar nos tecidos e estão limitados principalmente à circulação no sangue e aos fluidos extracelulares (Tang et al., 2004). A distribuição aos tecidos ocorre por pinocitose (transporte vesicular) mediada por um recetor específico e saturável: o recetor do fragmento cristalizável neonatal (FcRn). O FcRn é encontrado nas células endoteliais vasculares e nas células apresentadoras de antígeno, apresentando um papel de proteção contra a degradação da IgG. Esta proteção explica a semi-vida longa de cerca de 3 semanas dos mAb. O recetor FcRn permite a passagem dos mAb do sangue circulante para os tecidos e vice-versa (Paintaud, 2009). Os mAb com um grande peso molecular são absorvidos principalmente pelo sistema linfático, pelo que, é interessante considerar que o sistema linfático pode também estar envolvido no transporte de mAb (Dahlberg et al., 2014).

III.1.3. Metabolização

A degradação das proteínas pode ocorrer por meio de dois mecanismos principais, a via lisossómica e a via mediada pela ubiquitina. As proteínas exógenas, como as proteínas terapêuticas e os mAb, são degradadas pela via lisossómica, por endocitose mediada por recetor específico ou pinocitose não específica (Lin, 2009).

O bedinvetmab e o frunevetmab não são metabolizados pelo sistema citocromo P450 (uma grande família de metaloenzimas responsáveis pelo metabolismo oxidativo, CYPs), devido ao seu elevado peso molecular e ao seu estatuto de biomoléculas. De facto, os IgGs são caracterizados por um elevado peso molecular (cerca de 150.000 Da), em comparação com outros fármacos (geralmente menos de

1.000 Da). Portanto, torna-se improvável que estas substâncias ativas sofram interações com medicamentos concomitantes que sejam substratos, indutores ou inibidores das enzimas do citocromo P450.

III.1.4. Eliminação

Os principais mecanismos de eliminação dos fármacos incluem a filtração (por exemplo, renal), a secreção (por exemplo, hepática) e biotransformação (metabolismo ou catabolismo). Ao contrário da maioria dos fármacos, a eliminação dos mAb não ocorre pelas vias clássicas de excreção renal devido ao seu alto peso molecular (Keizer et al., 2010). Além disso, a secreção na biliar não contribui significativamente para a eliminação de anticorpos IgG (Wang et al., 2008). A eliminação dos mAb é feita principalmente por catabolismo intracelular, uma vez que a captação na célula foi realizada por pinocitose ou por endocitose secundária à ligação ao seu alvo ou a um receptor (Paintaud, 2009).

III.2. Farmacodinamia

Os mAb, sendo proteínas, podem induzir anticorpos direcionados contra si mesmos, refletindo uma imunogenicidade (capacidade de uma proteína induzir uma resposta imune) transitória ou persistente (W. Wang et al., 2008). Consequentemente, esta imunogenicidade induzida pode facilitar a eliminação e reduzir a eficácia do fármaco a médio/longo prazo, após várias utilizações, em animais que tiveram uma excelente resposta ao tratamento anteriormente.

Os estudos de campo em cães com artrose recebendo bedinvetmab uma vez por mês mostraram que o desenvolvimento de anticorpos anti-bedinvetmab era pouco frequente. Nenhum cão exibiu sinais clínicos adversos considerados associados à ligação dos anticorpos ao bedinvetmab (EMA Librela, 2021-a).

Os mAb terapêuticos têm 3 modos principais de ação: podem ter efeitos agonistas ou antagonistas de diferentes ações moleculares ou de receptores específicos; atingir células específicas (por exemplo, células tumorais) e causar uma lise celular; ou atuar como moléculas de sinalização (Wang et al., 2008). O bedinvetmab e frunvetmab desempenham o papel de antagonista ao se ligarem à neurotrofina NGF, bloqueando assim sua compatibilidade com seu receptor TrkA, já que NGF atua como proteína de sinalização solúvel (Enomoto et al., 2019).

IV. Perspetivas terapêuticas dos anticorpos monoclonais

Os mAb já são utilizados em medicina veterinária, nomeadamente no tratamento da atopia canina (lokivetmab). Para obter um efeito analgésico, um dos alvos específicos pode ser o NGF, que como referido atrás é um importante mediador da inflamação e da dor em adultos; e que é secretado em

excesso nas articulações inflamadas e é uma das principais causas de hiperalgesia primária induzida por inflamação periférica.

IV. Eficácia analgésica dos anticorpos monoclonais anti- *nerve growth factor*

IV.1. Dados obtidos em modelos experimentais

A eficácia analgésica dos mAbs anti-NGF foi demonstrada em vários modelos experimentais de artrose em roedores. Os estudos em cães e gatos demonstraram uma inervação simpática associada aos osteófitos e à placa óssea subcondral (Miller et al., 2017). Em ratos, um tratamento com um agente anti-NGF murino (monoiodoacetato) em modelo de artrose induziu uma redução do número de osteoclastos, associada a um efeito analgésico, sem redução dos danos ao nível da cartilagem ou da inflamação sinovial (Xu et al., 2016).

IV.2. Ensaios clínicos no cão

Foi realizado um estudo em 2015 (Lascelles et al., 2015), utilizando o ranevetmab (NV-01 ou anti-NGF recombinante canino) na dose de 200 µg/kg por via intravenosa, envolvendo 26 cães por um período de 28 dias. Os resultados clínicos foram avaliados escore índice canino de osteoartrite de Liverpool (LOAD) e o efeito analgésico durou pelo menos quatro semanas.

Um estudo piloto europeu duplo-cego randomizado multicêntrico, sobre o bedinvetmab foi realizado durante 3 meses, reunindo 287 cães de 26 centros de atendimento médico veterinários. Cento e quarenta e seis cães receberam três administrações de solução salina e 141 cães três administrações subcutâneas de bedinvetmab (dose de 0,5 a 1 mg/kg) (EMA, 2021a).

O método de avaliação da dor utilizado foi a escala *canine brief pain inventory* (CBPI) que avalia a evolução da gravidade da dor com a pontuação da gravidade da dor (PSS) nos últimos sete dias (máximo, médio e mínimo) em comparação ao dia do exame: A avaliação também incluiu o impacto na atividade, o humor, as habilidades para levantar-se, andar, correr e subir escadas, avaliando a interferência da dor com a pontuação de interferência da dor (PIS). Por fim, avaliou também a qualidade de vida nos últimos sete dias (excelente, muito boa, boa, regular ou má

Os resultados obtidos quatro semanas após a primeira administração revelaram uma taxa de sucesso no controlo da dor de 43,5% no grupo bedinvetmab, em comparação com 16,9% no grupo placebo. Catorze dias após a segunda administração (realizada 30 dias após a primeira) revelaram uma taxa de sucesso de 53% no grupo de tratamento contra 21% no grupo placebo. Após três meses, apenas o grupo tratado com bedinvetmab foi acompanhado por mais seis meses, incluindo 78 cães que

receberam seis injeções mensais adicionais. Os dados do estudo com duração de nove meses indicaram uma eficácia sustentada do tratamento.

IV.3. Efeitos adversos no cão

Vários efeitos adversos foram reportados durante os três meses do estudo piloto: 2,9% dos animais do grupo de tratamento apresentaram vômito (placebo: 0,7%), 3,6% letargia (placebo: 0%), 2,2% anorexia (placebo: 0%), 2,2% dor nas articulações (placebo: 15,4%), 2,2% claudicação (placebo 0,7%), 2,2% tosse (placebo: 0,7%). Algumas reações no local da administração (dor, edema, calor) também foram descritas, mas com baixa frequência (entre 1 e 10 animais em 1000 tratados). Nenhum caso de osteoartrite progressiva aguda (RPOA) foi observado em cães. (Krautmann et al., 2021).

IV.4. Ensaios clínicos no gato

Um estudo randomizado duplo-cego foi realizado como frunvetmab (NV-02 ou anti-NGF recombinante felino) em gatos. Durante seis semanas, os valores das medidas de atividade aumentaram significativamente e os scores do *client-specific outcome measures* (CSOM) melhoraram em 34 gatos com artrose (Gruen et al., 2016).

As CSOM são grelhas de avaliação da dor crônica que apelam à observação dos tutores para avaliar critérios livres de escolher e específicos do mal-estar associado a qualquer dor crônica. Avalia a incapacidade funcional, a qualidade da dor e os distúrbios emocionais na origem das alterações comportamentais,, incluindo a dificuldade em realizar uma atividade ou a frequência de mudanças comportamentais. A pontuação final resulta do somatório das pontuações de 3 itens previamente escolhidos pelo tutor (por exemplo correr, se levantar e distúrbios do sono). O objetivo é então ter um acompanhamento no tempo das CSOM incluídas no seguimento do tratamento de forma a traduzir o grau de alívio, ou não, da terapêutica analgésica.

O estudo piloto randomizado incluiu 182 gatos no grupo tratado com o frunvetmab e 93 gatos no grupo placebo. O grupo tratado com o frunvetmab recebeu uma administração subcutânea por mês, com três administrações no total, nas doses de 7 mg em gatos com menos de 7 kg e 14 mg em gatos com mais de 7 kg. Os critérios de sucesso foram definidos como uma redução maior que dois na pontuação total do CSOM e nenhum aumento na pontuação individual. O sucesso foi alcançado em 66,70%, 75,91% e 76,47% dos gatos tratados com frunvetmab e em 52,06%, 64,65% e 68,09% dos gatos tratados com placebo, após respetivamente um, dois e três meses de tratamento.

A utilização dos mAb anti-NGF por via injetável com administrações mensais tem ainda a vantagem de ultrapassar a dificuldade na administração oral de medicamentos em gatos e à presença frequente de comorbilidades como a insuficiência renal, o hipertireoidismo e a diabetes *mellitus*. Até o momento,

nenhum estudo demonstrou a segurança e a eficácia do frunevetmab em gatos com doença renal crónica em estadio 3 ou 4 definida pela *International Renal Interest Society* (IRIS).

IV.5. Efeitos adversos no gato

Os efeitos adversos observados durante o período do estudo incluíram reações cutâneas locais (prurido, dermatite e alopecia) que apareceram frequentemente (entre 1 e 10 animais em 100 tratados). Nenhum caso de RPOA foi observado em gatos (EMA, 2021b).

IV.6. Ensaios clínicos no homem

Um estudo clínico de fase II sobre o tanezumab (mAb anti-NGF em humanos) foi realizado em 2010 em 450 doentes com artrose do joelho com idade entre 40 e 75. Foi revelada uma redução significativa da dor até menos de 50% (incluindo as doses mais elevadas) (Lane et al., 2010). No entanto, 2,2% dos casos apresentaram RPOA, exigindo posteriormente a colocação de próteses totais do joelho ou anca (Chang et al., 2016). Atualmente, as explicações para o aparecimento da RPOA são desconhecidas, embora o uso excessivo das articulações devido à diminuição / ausência de dor possa ser uma das causas. Alguns distúrbios neurológicos (sensação de queimadura, alodinia, parestesia, disestesia, neuralgia, perda de sensibilidade) também foram descritos em diferentes estudos, com uma frequência de 4,3% a 33% (Brown et al., 2014; Schnitzer & Marks, 2015).

Por fim, um estudo randomizado duplo-cego foi realizado na Europa e no Japão em 2019 em 849 doentes com artrose do joelho ou da anca moderada a grave. Os doentes não responsivos ou intolerantes aos analgésicos convencionais tiveram resultados favoráveis no controlo da dor embora tenham sido relatados 2,5% de casos com RPOA (Berenbaum et al., 2020).

Conclusão

Atualmente a OMS define a dor crónica como uma doença, pelo que o seu manejo clínico é fundamental como forma de garantir o bem-estar animal.

Atualmente, os mAb anti-NGF desempenham um papel importante no tratamento da dor osteoarticular crónica em cães e gatos, sendo o NGF um mediador chave da neuro-inflamação através da interação do sistema nervoso e do sistema imunitário. As características farmacocinéticas confirmam a sua eficácia a longo prazo e apresentam uma elevada segurança devido à sua elevada especificidade e o seu modo de eliminação. O principal objetivo do anticorpo monoclonal anti-NGF é ligar-se ao NGF para impedir a sua ligação ao recetor TrkA na superfície dos nociceptores e dos mastócitos. Além disso, a inflamação induzida pela imunidade inata e a inflamação neurogénica pode ser bloqueada, levando uma ação mais preventiva do que curativa contra a inflamação articular.

A utilização dos mAb anti-NGF revela-se assim uma alternativa de eleição no tratamento da dor crónica relacionada com a artrose, dada a sua comprovada eficácia ao longo prazo. No entanto, a maioria dos ensaios clínicos realizados visa principalmente os animais monomórbidos e altamente selecionados, favorecendo uma abordagem da dor da artrose como uma única doença. O objetivo futuro seria realizar os ensaios clínicos incluindo perfis de multimorbidade para confirmar esses resultados promissores.

Uma visão multidisciplinar da artrose é um fator chave no manejo da dor. A escolha do clínico no estabelecimento do tratamento para o animal osteoartrítico reside na capacidade de diminuir a dor de forma a melhorar a mobilidade do animal. Assim, um tratamento de longa duração com os mAb anti-NGF pode constituir um excelente tratamento de base, podendo ser complementado com outros anti-inflamatórios a curto prazo, se necessário, de forma a promover a mobilidade e assim sugerir outras soluções terapêuticas adicionais (fisioterapia, balneoterapia). Não se deve esquecer que o tratamento global da artrose envolve também a sensibilização e a educação dos tutores sobre os principais fatores de risco, as diferentes formas de cuidar (massagem, terapia ocupacional entre outros) e a importância, em medicina humano como em medicina veterinária, do estabelecimento de uma alimentação clínica.

Bibliografia

- Abramoff, B., & Caldera, F. E. (2020). Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *The Medical Clinics of North America*, 104(2), 293–311.
<https://doi.org/10.1016/J.MCNA.2019.10.007>
- Aloe, L., Tuveri, M. A., Carcassi, U., & Levi-Montalcini, R. (1992). Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 35(3), 351–355.
<https://doi.org/10.1002/ART.1780350315>
- Ängeby Möller, K., Berge, O. G., Finn, A., Stenfors, C., & Svensson, C. I. (2015). Using gait analysis to assess weight bearing in rats with Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis to improve predictivity: Interfering with the cyclooxygenase and nerve growth factor pathways. *European Journal of Pharmacology*, 756, 75–84. <https://doi.org/10.1016/J.EJPBAR.2015.02.050>
- Bellet, D., Pecking, A., & Dangles-Marie, V. (2008). [XenoMouse: a feat for obtaining human antibodies in mice]. *Medecine Sciences : M/S*, 24(11), 903–905.
<https://doi.org/10.1051/MEDSCI/20082411903>
- Berenbaum, F., Blanco, F. J., Guermazi, A., Miki, K., Yamabe, T., Viktrup, L., Junor, R., Carey, W., Brown, M. T., West, C. R., & Verburg, K. M. (2020). Subcutaneous tanezumab for osteoarthritis of the hip or knee: efficacy and safety results from a 24-week randomised phase III study with a 24-week follow-up period. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 79(6), 800–810.
<https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2019-216296>
- Brown, M. T., Herrmann, D. N., Goldstein, M., Burr, A. M., Smith, M. D., West, C. R., Verburg, K. M., & Dyck, P. J. (2014). Nerve safety of tanezumab, a nerve growth factor inhibitor for pain treatment. *Journal of the Neurological Sciences*, 345(1–2), 139–147.
<https://doi.org/10.1016/J.JNS.2014.07.028>
- Castelli, M. S., McGonigle, P., & Hornby, P. J. (2019). The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacology Research & Perspectives*, 7(6), e00535.
<https://doi.org/10.1002/PRP2.535>
- Chang, D. S., Hsu, E., Hottinger, D. G., & Cohen, S. P. (2016). Anti-nerve growth factor in pain management: current evidence. *Journal of Pain Research*, 9, 373–383.
<https://doi.org/10.2147/JPR.S89061>
- Dahlberg, A. M., Kaminskas, L. M., Smith, A., Nicolazzo, J. A., Porter, C. J. H., Bulitta, J. B., & McIntosh, M. P. (2014). The lymphatic system plays a major role in the intravenous and subcutaneous pharmacokinetics of trastuzumab in rats. *Molecular Pharmaceutics*, 11(2), 496–504.
<https://doi.org/10.1021/MP400464S>
- Denk, F., Bennett, D. L., & McMahon, S. B. (2017). Nerve Growth Factor and Pain Mechanisms. *Annual Review of Neuroscience*, 40, 307–325. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-072116-031121>
- EMA. (2021a). ANNEXE I RÉSUMÉ DES CARACTÉRISTIQUES DU PRODUIT LIBRELA.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/librela-epar-product-information_fr.pdf

- EMA. (2021b). ANNEXE I RÉSUMÉ DES CARACTÉRISTIQUES DU PRODUIT SOLENSIA.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/solensia-epar-product-information_fr.pdf
- EMA. (2021c). EMA. Assessment report as adopted by the CVMP with all information of a commercially confidential nature deleted. *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use Assessment Report for Librela*. www.ema.europa.eu/contact
- EMA. (2021d). EMA. Assessment report as adopted by the CVMP with all information of a commercially confidential nature deleted. *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use Assessment Report for Solensia*. www.ema.europa.eu/contact
- Enomoto, M., Mantyh, P. W., Murrell, J., Innes, J. F., & Lascelles, B. D. X. (2019). Anti-nerve growth factor monoclonal antibodies for the control of pain in dogs and cats. *The Veterinary Record*, 184(1). <https://doi.org/10.1136/VR.104590>
- Epstein, M. E. (2019). Anti-nerve growth factor monoclonal antibody: a prospective new therapy for canine and feline osteoarthritis. *The Veterinary Record*, 184(1), 20–22.
<https://doi.org/10.1136/VR.K5292>
- Freund-Michel, V., & Frossard, N. (2008). The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 117(1), 52–76.
<https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2007.07.003>
- Fusco, M., Skaper, S. D., Coaccioli, S., Varrassi, G., & Paladini, A. (2017). Degenerative Joint Diseases and Neuroinflammation. *Pain Practice : The Official Journal of World Institute of Pain*, 17(4), 522–532. <https://doi.org/10.1111/PAPR.12551>
- Gruen, M. E., Thomson, A. E., Griffith, E. H., Paradise, H., Gearing, D. P., & Lascelles, B. D. X. (2016). A Feline-Specific Anti-Nerve Growth Factor Antibody Improves Mobility in Cats with Degenerative Joint Disease-Associated Pain: A Pilot Proof of Concept Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(4), 1138–1148. <https://doi.org/10.1111/JVIM.13972>
- Hoheisel, U., Unger, T., & Mense, S. (2005a). Excitatory and modulatory effects of inflammatory cytokines and neurotrophins on mechanosensitive group IV muscle afferents in the rat. *Pain*, 114(1–2), 168–176. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2004.12.020>
- Hoheisel, U., Unger, T., & Mense, S. (2005b). Excitatory and modulatory effects of inflammatory cytokines and neurotrophins on mechanosensitive group IV muscle afferents in the rat. *Pain*, 114(1–2), 168–176. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2004.12.020>
- Isola, M., Ferrari, V., Miolo, A., Stabile, F., Bernardini, D., Carnier, P., & Busetto, R. (2011). Nerve growth factor concentrations in the synovial fluid from healthy dogs and dogs with secondary osteoarthritis. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology : V.C.O.T.*, 24(4), 279–284. <https://doi.org/10.3415/VCOT-10-04-0051>
- Keizer, R. J., Huitema, A. D. R., Schellens, J. H. M., & Beijnen, J. H. (2010). Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clinical Pharmacokinetics*, 49(8), 493–507.
<https://doi.org/10.2165/11531280-000000000-00000>

- Krautmann, M., Walters, R., Cole, P., Tena, J., Bergeron, L. M., Messamore, J., Mwangi, D., Rai, S., Dominowski, P., Saad, K., Zhu, Y., Guillot, M., & Chouinard, L. (2021). Laboratory safety evaluation of bedinvetmab, a canine anti-nerve growth factor monoclonal antibody, in dogs. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 276. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2021.105733>
- Lane, N. E., Schnitzer, T. J., Birbara, C. A., Mokhtarani, M., Shelton, D. L., Smith, M. D., & Brown, M. T. (2010). Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee. *The New England Journal of Medicine*, 363(16), 1521–1531. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0901510>
- Lascelles, B. D., Knazovicky, D., Case, B., Freire, M., Innes, J. F., Drew, A. C., & Gearing, D. P. (2015). A canine-specific anti-nerve growth factor antibody alleviates pain and improves mobility and function in dogs with degenerative joint disease-associated pain. *BMC Veterinary Research*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S12917-015-0413-X>
- Lin, J. (2009). Pharmacokinetics of biotech drugs: peptides, proteins and monoclonal antibodies. *Current Drug Metabolism*, 10(7), 661–691. <https://doi.org/10.2174/138920009789895499>
- McDonnell, S. (2015). *Production of Antibodies in Hybridoma and Non-hybridoma Cell Lines*. 65–88. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4_3
- Miller, R. E., Block, J. A., & Malfait, A. M. (2017). Nerve growth factor blockade for the management of osteoarthritis pain: what can we learn from clinical trials and preclinical models? *Current Opinion in Rheumatology*, 29(1), 110–118. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000354>
- Mills, C. D., Nguyen, T., Tanga, F. Y., Zhong, C., Gauvin, D. M., Mikusa, J., Gomez, E. J., Salyers, A. K., & Bannon, A. W. (2013). Characterization of nerve growth factor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in rats. *European Journal of Pain (London, England)*, 17(4), 469–479. <https://doi.org/10.1002/J.1532-2149.2012.00202.X>
- Minnone, G., De Benedetti, F., & Bracci-Laudiero, L. (2017). NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/IJMS18051028>
- Montagnoli, C., Tiribuzi, R., Crispoltoni, L., Pistilli, A., Stabile, A. M., Manfreda, F., Placella, G., Rende, M., & Cerulli, G. G. (2017). β -NGF and β -NGF receptor upregulation in blood and synovial fluid in osteoarthritis. *Biological Chemistry*, 398(9), 1045–1054. <https://doi.org/10.1515/HSZ-2016-0280>
- Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., & Oi, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(21), 6851–6855. <https://doi.org/10.1073/PNAS.81.21.6851>
- Murphy K. Janeway's. (2015). *Immunobiology* (Garland Science, Ed.; 8th ed.).
- Nelson, P. N., Reynolds, G. M., Waldron, E. E., Ward, E., Giannopoulos, K., & Murray, P. G. (2000). Monoclonal antibodies. *Molecular Pathology : MP*, 53(3), 111–117. <https://doi.org/10.1136/MP.53.3.111>

- Nicol, G. D., & Vasko, M. R. (2007). Unraveling the story of NGF-mediated sensitization of nociceptive sensory neurons: ON or OFF the Trks? *Molecular Interventions*, 7(1), 26–41.
<https://doi.org/10.1124/MI.7.1.6>
- Nilsson, G., Forsberg-Nilsson, K., Xiang, Z., Hallböök, F., Nilsson, K., & Metcalfe, D. D. (1997). Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *European Journal of Immunology*, 27(9), 2295–2301. <https://doi.org/10.1002/EJL.1830270925>
- Paintaud, G. (2009). [Pharmacokinetics (PK) of mAbs]. *Medecine Sciences : M/S*, 25(12), 1057–1062.
<https://doi.org/10.1051/MEDSCI/200925121057>
- Pereira, D., Ramos, E., & Branco, J. (2015). Osteoarthritis. *Acta Medica Portuguesa*, 28(1), 99–106.
<https://doi.org/10.20344/AMP.5477>
- Pezet, S., & McMahon, S. B. (2006). Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 507–538.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.29.051605.112929>
- Posner, J., Barrington, P., Brier, T., & Datta-Mannan, A. (2019). Monoclonal Antibodies: Past, Present and Future. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 260, 81–141.
https://doi.org/10.1007/164_2019_323
- Priestley, J. V., Michael, G. J., Averill, S., Liu, M., & Willmott, N. (2002). Regulation of nociceptive neurons by nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 80(5), 495–505. <https://doi.org/10.1139/Y02-034>
- Ricci, A., Greco, S., Mariotta, S., Felici, L., Amenta, F., & Bronzetti, E. (2000). Neurotrophin and neurotrophin receptor expression in alveolar macrophages: an immunocytochemical study. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 18(3), 193–202.
<https://doi.org/10.3109/08977190009003244>
- Rocco, M. L., Soligo, M., Manni, L., & Aloe, L. (2018). Nerve Growth Factor: Early Studies and Recent Clinical Trials. *Current Neuropharmacology*, 16(10), 1455–1465.
<https://doi.org/10.2174/1570159X16666180412092859>
- Schnitzer, T. J., & Marks, J. A. (2015). A systematic review of the efficacy and general safety of antibodies to NGF in the treatment of OA of the hip or knee. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23 Suppl 1, S8–S17. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2014.10.003>
- Shepard, H. M., Phillips, G. L., Thanos, C. D., & Feldmann, M. (2017). Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. *Clinical Medicine (London, England)*, 17(3), 220–232. <https://doi.org/10.7861/CLINMEDICINE.17-3-220>
- Sorkin, L. S., Eddinger, K. A., Woller, S. A., & Yaksh, T. L. (2018). Origins of antidromic activity in sensory afferent fibers and neurogenic inflammation. *Seminars in Immunopathology*, 40(3), 237–247. <https://doi.org/10.1007/S00281-017-0669-2>
- Stoppiello, L. A., Mapp, P. I., Wilson, D., Hill, R., Scammell, B. E., & Walsh, D. A. (2014). Structural associations of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 66(11), 3018–3027. <https://doi.org/10.1002/ART.38778>

- Tang, L., Persky, A. M., Hochhaus, G., & Meibohm, B. (2004). Pharmacokinetic aspects of biotechnology products. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(9), 2184–2204. <https://doi.org/10.1002/JPS.20125>
- Tellegen, A. R., Dessing, A. J., Houben, K., Riemers, F. M., Creemers, L. B., Mastbergen, S. C., Meij, B. P., Miranda-Bedate, A., & Tryfonidou, M. A. (2019). Dog as a Model for Osteoarthritis: The FGF4 Retrogene Insertion May Matter. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 37(12), 2550–2560. <https://doi.org/10.1002/JOR.24432>
- Wang, Q., Lepus, C. M., Raghu, H., Reber, L. L., Tsai, M. M., Wong, H. H., Von Kaeppler, E., Lingampalli, N., Bloom, M. S., Hu, N., Elliott, E. E., Oliviero, F., Punzi, L., Giori, N. J., Goodman, S. B., Chu, C. R., Sokolove, J., Fukuoka, Y., Schwartz, L. B., ... Robinson, W. H. (2019). IgE-mediated mast cell activation promotes inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.39905>
- Wang, W., Wang, E. Q., & Balthasar, J. P. (2008). Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 84(5), 548–558. <https://doi.org/10.1038/CLPT.2008.170>
- Wu, Z., Nagata, K., & Iijima, T. (2000). Immunohistochemical study of NGF and its receptors in the synovial membrane of the ankle joint of adjuvant-induced arthritic rats. *Histochemistry and Cell Biology*, 114(6), 453–459. <https://doi.org/10.1007/S004180000222>
- Xu, L., Nwosu, L. N., Burston, J. J., Millns, P. J., Sagar, D. R., Mapp, P. I., Meesawatsom, P., Li, L., Bennett, A. J., Walsh, D. A., & Chapman, V. (2016). The anti-NGF antibody muMab 911 both prevents and reverses pain behaviour and subchondral osteoclast numbers in a rat model of osteoarthritis pain. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(9), 1587–1595. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2016.05.015>
- Zhuang, Z. Y., Xu, H., Clapham, D. E., & Ji, R. R. (2004). Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(38), 8300–8309. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2893-04.2004>