



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 89610

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 39/395

A61P 29/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНОГО БОЛЮ ШЛЯХОМ ЗАСТОСУВАННЯ АНТАГОНІСТА ФАКТОРА РОСТУ НЕРВІВ ТА КОМПОЗИЦІЇ, ЩО ЙОГО МІСТЯТЬ

1

(21) a200504330
(22) 08.10.2003
(24) 25.02.2010
(86) PCT/US03/32089, 08.10.2003
(31) 60/417,237
(32) 08.10.2002
(33) US
(46) 25.02.2010, Бюл.№ 4, 2010 р.
(72) ШЕЛТОН ДЕВІД Л., US, ВЕРГАРА ДЖЕРМАН ДЖ., US
(73) РІНАТ НЬЮРОСАЙЕНС КОРП., US
(56) WO 01/78698 A, 25.10.2001
WO 01/64247 A, 07.09.2001
LEEM J W ET AL: "Anti-NGF treatment suppresses abnormal pain behaviors induced after spinal cord injury in the rat" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 26, no. 1-2, 2000, pages Abstract No.-633.1, XP009071058
BRENNAN T J ET AL: "Role of nerve growth factor in a rat model for postoperative pain" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 24, no. 1-2, 1998, page 880, XP009071059
HONGO J-A S ET AL: "ANTIBODY BINDING REGIONS ON HUMAN NERVE GROWTH FACTOR IDENTIFIED BY HOMOLOG- AND ALANINE-SCANNING MUTAGENESIS" HYBRIDOMA, LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 19, no. 3, 2000, pages 215-227, XP002951932
KOIZUMI S ET AL: "K-252A A SPECIFIC INHIBITOR OF THE ACTION OF NERVE GROWTH FACTOR

2

ON PC12 CELLS" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 8, no. 2, 1988, pages 715-721, XP002396483
US 2002/0028779 A1, 07.03.2002
(57) 1. Спосіб лікування післяопераційного болю в індивідуума, що включає введення індивідууму ефективної кількості антагоніста фактора росту нервів (NGF), який є антагоністичним антитілом проти NGF.
2. Спосіб за п. 1, де пригнічується або полегшується біль у спокої.
3. Спосіб за п. 1, де пригнічується або полегшується механічно викликаний біль.
4. Спосіб за п. 1, де антагоністичне антитіло проти NGF являє собою людське антитіло.
5. Спосіб за п. 1, де антагоністичне антитіло проти NGF являє собою гуманізоване антитіло.
6. Спосіб за п. 1, де антагоністичне антитіло проти NGF зв'язує людський NGF.
7. Спосіб за п. 6, де антагоністичне антитіло проти NGF зв'язує людський NGF з афінитетом зв'язування приблизно 0,1 нМ або менше, ніж приблизно 0,1 нМ.
8. Фармацевтична композиція для лікування післяопераційного болю, що містить фармацевтично ефективну кількість антагоністичного антитіла проти NGF і фармацевтично прийнятний носій.
9. Набір для лікування післяопераційного болю, який включає антагоніст NGF та інструкції по застосуванню антагоніста NGF для лікування післяопераційного болю, де антагоніст NGF є антагоністичним антитілом проти NGF.

Даний винахід був створений за підтримки Уряду США у відповідності до контракту №DAAD19-03-C-0006, наданої агентством DARPA. Уряд США має певні права на даний винахід.

Даний винахід відноситься до застосування антагоніста фактора росту нервів (NGF) для запобігання, полегшення або лікування післяопераційного болю.

Фактор росту нервів (NGF) був першим ідентифікованим нейротропіном, і його роль в розвитку

та виживанні і периферичних, і центральних нейронів була достатньо охарактеризована. Було показано, що NGF є вирішальним фактором виживання і підтримки в розвитку периферичних симпатичних і ембріональних сенсорних нейронів, і холінергічних нейронів основи переднього мозку (Smeyne, et al., Nature 368: 246-249 (1994); Crowley, et al., Cell 76: 1001-1011 (1994)). NGF стимулює регулює експресію нейропептидів у сенсорних нейронах (Lindsay, et al., Nature 337:

(13) C2

(11) 89610

(19) UA

362-364 (1989)), і його активність опосередкована через 2 різних зв'язаних з мембраною рецептори, рецептор тирозинкінази TrkA і рецептор p75, який структурно зв'язаний з іншими членами сімейства рецепторів фактора некрозу пухлини (Chao, et al., *Science* 232: 518-521 (1986)).

У доповнення до впливів NGF на нервову систему, з'являється все більше даних про його участь в процесах поза нервовою системою. Наприклад, було показано, що екзогенно введений NGF посилює судинну проникність (Oftten, et al., *Eur J. Pharmacol.* 106: 199-201 (1984)), посилює T- і B-клітинні імунні реакції (Oftten, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10059-10063 (1989)), викликає диференціювання лімфоцитів і проліферацію тучних клітин, і спричиняє вивільнення розчинних біологічних сигналів з тучних клітин (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)). Хоча було показано, що NGF, який додається екзогенно, здатний спричиняти всі вказані ефекти, важливо зазначити, що лише зрідка було показано, що ендогенний NGF важливий при будь-якому з вказаних процесів *in vivo* (Torcia, et al., *Cell* 85(3): 345-56 (1996)). Тому не зрозуміло, який може бути ефект інгібування біологічної активності ендогенного NGF, якщо він має місце.

NGF продукується рядом типів клітин, включаючи тучні клітини (Leon, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3739-3743 (1994)), В-лімфоцити (Torcia, et al., *Cell* 85: 345-356 (1996)), кератиноцити (Di Marco, et al., *J. Biol. Chem.* 268: 22838-22846)), гладком'язові клітини (Ueyama, et al., *J. Hypertens.* 11: 1061-1065 (1993)), фібробласти (Lindholm, et al., *Eur. J. Neurosci.* 2: 795-801 (1990)), бронхіальні епітеліальні клітини (Kassel, et al., *Clin. Exp. Allergy* 31: 1432-40 (2001)), ниркові мезангіальні клітини (Steiner, et al., *Am. J. Physiol.* 261: F792-798 (1991)) і міотрубочки скелетних м'язів (Schwartz, et al., *J. Photochem. Photobiol. B* 66: 195-200 (2002)). Рецептори NGF були виявлені на різноманітних типах клітин поза нервовою системою. Наприклад, TrkA був виявлений на моноцитах, T- і В-лімфоцитах і тучних клітинах людини.

Зв'язок між підвищеними рівнями NGF і різноманітними запальними станами спостерігався у хворих людей, а також на декількох експериментальних моделях у тварин. Вони включають системний червоний вовчак (Bracci-Laudiero, et al., *Neuroreport. Lett.* 4: 563-565 (1995)), розсіяний склероз (Bracci-Laudiero, et al., *Neurosci. Lett.* 147: 9-12 (1992)), псоріаз (Raychaudhuri, et al., *Acta Derm. Venereol.* 78: 84-86 (1998)), артрит (Falcimi, et al., *Ann. Rheum. Dis.* 55: 745-748 (1996)), інтерстиційний цистит (Okragly, et al., *J. Urology* 161: 438-441 (1991)) і астму (Braun, et al., *Eur. J. Immunol.* 28: 3240-3251 (1998)).

Отже, підвищення рівня NGF в периферичних тканинах пов'язане із запаленням, і це спостерігалося при ряді форм артриту. Синовіальна оболонка пацієнтів, уражених ревматоїдним артритом, виявляє високі рівні NGF, в той час, як повідомлялося про те, що в незапаленій синовіальній обо-

лонці NGF не виявляється (Aloe, et al., *Arch. Rheum.* 35: 351-355 (1992)). Аналогічні результати спостерігалися у щурів з експериментально викликаним ревматоїдним артритом (Aloe, et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 10: 203-204 (1992)). Повідомлялося про підвищення рівня NGF у трансгенних мишей з артритом, нарівні зі збільшенням кількості тучних клітин (Aloe, et al., *Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects* 15: 139-143 (1993)).

Лікування екзогенним NGF веде до посилення болю та больової чутливості. Це ілюструється тією обставиною, що ін'єкція NGF веде до значного посилення болю і больової чутливості і на експериментальних моделях у тварин (Amann, et al., *Pain* 64, 323-329 (1996); Andreev, et al., *Pain* 63, 109-115 (1995)) і людини (Dyck, et al., *Neurology* 48, 501-505 (1997); Petty, et al., *Annals Neural.* 36, 244-246 (1994)). Виявляється, що NGF діє через безліч механізмів, включаючи індукцію нейротропіну BDNF (Apfel, et al., *Mol. Cell. Neurosci.* 7(2), 134-142 (1996); Michael, et al., *J. Neurosci.* 17, 8476-8490 (1997)), який в свою чергу змінює обробку больових сигналів у спинному мозку (Hains, et al., *Neurosci. Lett.* 320(3), 125-8 (2002); Miletic, et al., *Neurosci. Lett.* 319(3), 137-40 (2002); Thompson, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(14), 7714-8 (1999)), викликаючи зміни периферичних і центральних з'єднань сенсорних нейронів і інших нейронів, що передають біль, в спинному мозку (Lewin, et al., *European Journal of Neuroscience* 6, 1903-1912 (1994); Thompson, et al., *Pain* 62, 219-231 (1995)), викликаючи зміни росту аксонів (Lindsay, RM, *J. Neurosci.* 8(7), 2394-405 (1998)), викликаючи експресію рецепторів брадикініну (Peterson et al., *Neuroscience* 83: 161-168 (1998)), викликаючи зміни експресії генів, відповідальних за активацію нервів і проведення в них, зокрема, іонних каналів (Boettger, et al., *Brain* 125 (Pt 2), 252-63 (2002); Kerr, et al., *Neuroreport* 12(14), 3077-8 (2001); Gould, et al., *Brain Res* 854(1-2), 19-29 (2000)), потенціювання зв'язаного з болем рецептора VR1 (Chuang, et al., *Nature* 411 (6840), 957-62 (2001)); і викликаючи патологічні зміни в м'язах (Foster, et al., *J. Pathol.* 197(2), 245-55 (2002)). Багато з вказаних змін відбуваються безпосередньо на сенсорних нейронах, що передають больове відчуття, і, очевидно, не залежать від супутнього запалення. Крім того, існують, щонайменше, 2 інших типи клітин, які, як відомо, реагують на NGF, і які можуть брати участь в змінах відчуття болю або больової чутливості. Повідомлялося, що перша з них, тучна клітина, реагує на NGF дегрануляцією (Yan, et al., *Clin. Sci. (Lond)* 80: 565-569 (1991)) або в інших дослідженнях викликає або збільшує продукцію або вивільнення медіатору спільно з іншими речовинами (Pearce and Thompson, *J. Physiol.* 372: 379-393 (1986), Kawamoto, et al., *J. Immunol.* 164: 6412-6419 (2002)). Було ясно показано у щурів, що больові реакції, опосередковані NGF, щонайменше, в деякій мірі опосередковані тучними клітинами (Lewin, et al., *Eur. J. Neurosci.* 6: 1903-1912 (1994); Woolf, et al., *J. Neurosci.* 16: 2716-2723 (1996)), хоча потенційну релевантність цього ще треба показати у людини. Також відомо, що первинні симпатичні нейрони реагують на NGF і також беруть

участь в больовій сигналізації (Aley, et al., *Neuroscience* 71: 1083-1090 (1996)). Ясно, що видалення симпатичної інервації модифікує гіперальгезію, що зазвичай спостерігається у відповідь на лікування NGF (Woolf, et al., *J. Neurosci.* 16: 2716-2723 (1996)).

Щорічно 23000000 пацієнтів зазнають хірургічних процедур. Біль зазвичай локалізується поблизу ділянки операції. Післяопераційний біль може мати 2 клінічно важливі аспекти, а саме, біль у спокої або біль, який виникає, коли пацієнт не рухається, і механічний біль, який посилюється рухом (кашель/чхання, вставання з ліжка, фізіотерапія тощо). Великою проблемою лікування післяопераційного болю при великих операціях є те, що препарати, що використовуються в даний час, мають різноманітні виражені побічні ефекти, які затримують видужання, продовжують госпіталізацію і піддають певні вразливі групи пацієнтів ризику важких ускладнень. Післяопераційний біль або біль, який виникає після операції або травматичного ушкодження, являє собою серйозну і часто важковилікову медичну проблему.

Існують 2 загальні категорії медикаментозної терапії для лікування болю, обидві з яких мають недоліки. Перша категорія включає нестероїдні протизапальні препарати (NSAID), які застосовуються для лікування незначного болю, але терапевтичне застосування яких обмежується небажаними шлунково-кишковими ефектами, такими як ерозія слизової оболонки шлунка, утворення пептичної виразки або запалення 12-палої кишки та товстої кишки. NSAID також можуть викликати токсичну дію на нирки при тривалому застосуванні. І, крім того, як описано нижче, не дуже ефективні для лікування болю, пов'язаного з певними станами, або такими, що виникають при них, включаючи післяопераційний біль. Друга категорія включає морфін та споріднені опіоїди, які застосовуються для лікування болю від помірного до важкого, але терапевтичне застосування яких обмежене в зв'язку з небажаними ефектами, такими як седативний ефект, сплутану свідомість, запор, пригнічення дихання, ниркова колика, толерантність до тривалого застосування та ризик залежності. Тому необхідні сполуки, які можна застосовувати для лікування болю, з меншою кількістю або відсутністю побічних ефектів.

Біль часто класифікують як «запальний», «нейропатичний» або «вісцеральний», але дані традиційні загальні позначення мають властиві їм проблеми. Вони надають механістичну аналогію або ідентичність серед усіх джерел болю в межах однієї з вказаних дуже загальних категорій. Дійсно, існує багато різних типів запального болю та джерел болю, які не є ні запальними, ні нейропатичними. Крім того, типи болю, які мають запальний компонент, і/або традиційно іменуються «запальними», не означають, що інші фізіологічні аспекти не беруть участі в больовому стані. Наприклад, і остеоартрит, і інтерстиційний цистит повинні були б бути визначені за їх назвами як стерильні запальні стани відповідно суглобів або сечового міхура, але ясно, що болі, пов'язані з вказаними двома станами, механістично абсолютно відмінні один

від одного. На це вказують різні ефекти даного типу протибольового лікарського лікування відносно вказаних типів болю. Більшість пацієнтів з остеоартритом отримують добре полегшення болю (щонайменше, спочатку) при лікуванні NSAID. Однак лікування NSAID абсолютно неефективне при інтерстиційному циститі.

Післяопераційний біль (що взаємозамінно іменується болем після розрізу) часто розглядається як різновид запального болю. Хоча у післяопераційному болі може бути «запальний» компонент, в нього чітко залучені додаткові механізми. Наприклад, під час операції або іншої травми розрізаються та рвуться і судини, і нерви. Це не відбувається в тканині, що піддається тільки запаленню. Ясно, що перерізання нерва може викликати активність, що продовжується, яка сприймається як болісна. Крім того, перерізання кров'яних судин веде до відносної ішемії тканини, також болісного стимулу, який не присутній під час одного запалення.

Різні механізми, що беруть участь у хірургічному або викликаному пошкодженням болю, в порівнянні із запаленням, ілюструються фармакологією, що змінюється, і анатомічними субстратами, що лежать в основі полегшення болю при двох станах. Yamamoto, et al., (*Brian Res.* 909(1-2): 138-144 (2001)) показали, що інгібування спинномозкової кислотної дипептидази, зв'язаної з N-ацетилом-альфа (NAALADase), викликає виражене послаблення механічного болю, який супроводжує запальний стимул ін'єкції карагінану. Однак у паралельних експерименту, де NAALADase інгібували ідентичним чином після розрізу, не було послаблення механічного болю. Дані спостереження демонструють, що біохімія або фармакологія, що лежать в основі післяопераційного болю, відрізняються від таких, що лежать в основі запального болю. Анатомічні структури, важливі в модуляції больового відчуття, також були досліджені при післяопераційних і інших больових станах (Pogatzki, et al., *Anesthesiology*, 96(5): 1153-1160 (May (2002))). Низхідні впливи для стовбура головного мозку, конкретніше, рострального середнього відділу довгастого мозку, є важливими медіаторами повторної гіперальгезії при загальних запальних, нейропатичних і вісцеральних больових станах. При пошкодженні ділянки стовбура головного мозку не спостерігалася зміна якої-небудь больової реакції, виміряної після розрізу. Дані результати вказують на те, що первинна і вторинна гіперальгезія після розрізу не модулюються низхідним впливом з RMM (рострального середнього відділу довгастого мозку). Відсутність внеску низхідних сприяючих впливів з RMM у вторинну гіперальгезію після розрізу ікроного м'яза підтримує твердження про те, що викликаний розрізом біль включав механізми, відмінні від запального та нейропатичного болю. У доповнення до очевидних відмінностей післяопераційного або викликаного травмою болю від запального, вісцерального або нейропатичного болю, ці результати демонструють, що механізми, що беруть участь в післяопераційному болі (або болі, викликаному травмою), чітко відрізняються від інших видів болю. Далі,

можливість застосування конкретного фармакологічного (або іншого) втручання при лікуванні післяопераційного болю не прогнозується шляхом тестування вказаного фармакологічного засобу або втручання на моделях запального, вісцерального або нейропатичного болю.

Зникнення болю у спокої і збереження болю при активності і у відповідь на механічні стимули біля ділянки рани також присутні у пацієнтів після операції (Moiniche, et al., *Acta Anaesthesiol. Scand.* 41: 785-9 (1997)). Дослідження свідчать про те, що біль у спокої і біль, що викликається внаслідок розрізу, ймовірно, передається різними популяціями висхідних волокон і/або різними рецепторами. Крім застосування місцевих анестетиків для інгібування цих викликаних реакцій, є декілька препаратів, які помітно зменшують біль при кашлі та русі після операції.

Було показано, що попереднє лікування місцевим анестетиком для блокування болю під час експериментального розрізу спочатку запобігає болю, що продовжується, і первинній механічній гіпералгезії. Біль від розрізу також зникає, коли лідокаїн ін'єкується після травми. Однак у міру послаблення дії місцевого анестетика, первинна гіпералгезія повертається. У пацієнтів ін'єкції місцевих анестетиків, зроблені перед операцією, приблизно еквівалентні ін'єкціям, зробленим для зменшення болю після операції (Moiniche, et al., *Anesthesiology* 96: 725-41 (2002)).

Клінічні експериментальні дослідження на добровольцях і преклінічна модель розрізу узгоджуються в тому, що введення місцевого анестетика перед або після розрізу приблизно еквівалентні. Активізація центральних нейронів, що передають біль, під час розрізу і підвищена чутливість не є необхідними для видів поведінки, пов'язаних з болем, через декілька днів. Скоріше, у випадку розрізів, посилення реактивності центральних нейронів і біль потребують аферентної входної імпульсації, що продовжується, від місця розрізу. Представляється, що після послаблення дії будь-якого анальгезуючого лікування, проведеного перед розрізом, знов підвищується чутливість хірургічної рани та генеруються больові реакції (Pogatzki, et al., *J. Neurophysiol* 87: 721 (2002)).

Ділянка гіпералгезії (включаючи не травмовану зону), викликану розрізами, також картували. Вторинна гіпералгезія (гіпералгезія поза ділянкою пошкодження) являє собою показник посиленої реактивності центральної нервової системи, тобто центральної сенсibiliзації. Було також зазначено, що ділянка запальної гіперемії або почервоніння (можливо, внаслідок аксонних рефлексів), викликана розрізом, відрізнялася від ділянки гіпералгезії. На відміну від болю в спокої і первинної механічної гіпералгезії, велика ділянка гіпералгезії ніколи не формувалася, коли перед розрізом робили ін'єкцію місцевого анестетика. Більше того, її не можна було усунути ін'єкцією місцевого анестетика після розрізу. У пацієнтів після операції у деяких випадках певні види лікування значно зменшують ділянку гіпералгезії, але істотно не модифікують клінічні показники післяопераційного болю (бальні оцінки болю і споживання опіоїдів).

Було показано, що при скороченні ділянки гіпералгезії після колектомії не відбувається істотного зменшення гострого болю, однак це пов'язано зі зменшенням кількості хворих, у яких розвинувся залишковий біль навіть через 6 місяців після колектомії (De Kock, et al., *Pain* 92: 373-80 (2001)).

Застосування антитіла проти NGF для лікування хронічного вісцерального болю було описано (див. публікацію PCT №WO 01/78698). Brennan et al. повідомляють про введення імунотоксину TrkA на щурячій моделі післяопераційного болю (див. Society for Neuroscience Abstracts 24(1-2) 880 (1998)).

Всі наведені в даному описі посилання, включаючи патентні заявки і публікації, повністю включені як посилання.

Даний винахід оснований на відкритті, що антагоністи NGF ефективні при лікуванні післяопераційного болю. Лікування спрямоване на один або декілька аспектів післяопераційного болю, як розкрито в даному описі.

В одному аспекті винахід включає спосіб запобігання або лікування післяопераційного болю (що взаємозамінно називається як «біль після розрізу» або «посттравматичний біль») введенням антагоніста фактора росту нервів (NGF). Було показано відповідно до винаходу, що антагоністи NGF здатні інгібувати або блокувати біль, що виникає внаслідок післяопераційного болю, включаючи біль внаслідок операції або різаної рани, або травми.

В іншому аспекті винахід включає способи зниження виникнення післяопераційного болю, полегшення післяопераційного болю, зменшення післяопераційного болю і/або затримки розвитку або прогресування післяопераційного болю в індивідуума, причому вказані способи включають введення ефективної кількості антагоніста NGF.

В іншому аспекті винахід включає способи збільшення больового порога в індивідуума, що включають введення ефективної кількості антагоніста NGF.

В іншому аспекті винахід включає способи посилення загоєння травматичної рани, викликані операцією і/або травмою, в індивідуума, що включають введення ефективної кількості антагоніста NGF.

У деяких варіантах реалізації біль у спокої пригнічується, полегшується і/або запобігається, у деяких варіантах реалізації механічно викликаний біль (включаючи біль в результат руху) пригнічується, полегшується і/або запобігається, і в деяких варіантах реалізації термічно викликаний біль пригнічується, полегшується і/або запобігається. У деяких варіантах реалізації механічно викликаний біль пригнічується, полегшується і/або запобігається введенням антитіла проти NGF. У деяких варіантах реалізації біль у спокої пригнічується, полегшується і/або запобігається введенням антитіла проти NGF. У деяких варіантах реалізації термічно викликаний біль пригнічується, полегшується і/або запобігається введенням антитіла проти NGF. У деяких варіантах реалізації алодинія (тобто, підвищена реакція (тобто, збільшена больова чутливість) на зазвичай не больовий стимул) пригнічується, полегшується і/або запобігається.

ється, і/або гіпералгезія (тобто, підвищена реакція на зазвичай больовий або неприємний стимул) пригнічується, полегшується і/або запобігається. У ще одних варіантах реалізації алодинія і/або гіпералгезія є термічною або механічною (тактильною) за природою, або болем у спокої. У деяких варіантах здійснення, біль являє собою хронічний біль. В інших варіантах реалізації біль пов'язаний з ділянкою розрізу, рани або травми і/або ділянкою, розташованою близько до ділянки розрізу, рани і/або травми, в ній або біля неї.

Антагоніст NGF, придатний для застосування у способах за винаходом, являє собою будь-який засіб, який може прямо або опосередковано привести до зниженої біологічної активності NGF. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF (наприклад, антитіло) зв'язує (фізично взаємодіє з) NGF, зв'язується з рецептором NGF (таким як рецептор *trkA* і/або *p75*) і/або зменшує (гальмує і/або блокує) низхідну передачу сигналів рецептором NGF (наприклад, інгібітори передачі сигналів кінзи). Відповідно, в деяких варіантах реалізації антагоніст NGF зв'язує (фізично взаємодіє з) NGF. В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF зв'язується з рецептором NGF (таким як рецептор *trkA* і/або *p75*). В інших варіантах реалізації антагоніст NGF зменшує (гальмує і/або блокує) низхідну передачу сигналів рецептором NGF (наприклад, інгібітори передачі сигналів кінзи). В інших варіантах реалізації антагоніст NGF інгібує (зменшує) синтез і/або вивільнення NGF. В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF являє собою антагоніст NGF, який не є імуноадгезином *TrkA* (тобто, є відмінним від імуноадгезину *TrkA*). В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF відмінний від антитіла проти NGF. В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF відмінний від імуноадгезину *TrkA* і відмінний від антитіла проти NGF. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF зв'язує NGF (такий як hNGF) і значно не зв'язується з спорідненими нейротропінами, такими як NT-3, NT4/5 і/або BDNF. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF вибраний з будь-якого одного або декількох: антитіла проти NGF, антисмислової молекули, направленої на NGF (включаючи анти смислову молекулу, направлену на нуклеїнову кислоту, що кодує NGF), анти смислову молекулу, направлену на рецептор NGF (такий як *TrkA* і/або *p75*) (включаючи антисмислову молекулу, направлену на нуклеїнову кислоту, що кодує рецептор NGF), сполуку, що інгібує NGF, структурний аналог NGF, домінантно-негативну мутацію рецептора *TrkA* і/або *p75*, який зв'язує NGF, антитіло проти *TrkA*, антитіло проти *p75* та інгібітор кінзи. В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF являє собою антитіло проти NGF. У ще одних варіантах реалізації антитіло проти NGF є гуманізованим (таким як описане в даному описі антитіло E3). У деяких варіантах реалізації антитіло проти NGF являє собою антитіло E3 (як описано в даному описі). В інших варіантах реалізації антитіло проти NGF включає один або декілька CDR антитіла E3 (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 або, в деяких варіантах реалізації, усі 6 CDR з E3). В інших варіантах реалізації антитіло є людським. У ще одних варіантах реалізації антитіло проти NGF

включає амінокислотну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, показану в таблиці 1 (SEQ ID NO:1) і амінокислотну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, показану в таблиці 2 (SEQ ID NO:2). У ще одних варіантах реалізації антитіло включає модифіковану константну ділянку, таку як константна ділянка, яка є імунологічно інертною, наприклад, не запускає опосередкований комплементом лізис, або не стимулює антитіло-залежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC). В інших варіантах реалізації константна ділянка модифікована, як описано в Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624; заявці PCT №PCT/GB/01441 і/або в заявці на патент Великобританії №9809951.8.

У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF зв'язується з NGF. У ще одних варіантах реалізації антагоніст NGF являє собою антитіло, яке специфічно зв'язується з NGF (таким як людський NGF). У ще одних варіантах реалізації антитіло зв'язує по суті той самий епітоп NGF, що і антитіло, вибране з будь-якого одного або декількох з наступних мишачих моноклональних антитіл: MAb 911, MAb 912 і MAb 938 (див. Hongo, et al., Hybridoma 19: 215-227 (2000)). У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF зв'язується з рецептором *trkA*. Антагоніст NGF може являти собою моноклональне антитіло проти людського NGF (анти-hNGF), яке здатне зв'язуватися з hNGF і ефективно інгібувати зв'язування hNGF з людським *TrkA* (hTrkA) і/або ефективно інгібувати активацію рецептора людського *TrkA*.

Афінітет зв'язування антитіла проти NGF з NGF (таким як hNGF) може складати від приблизно 0,10nM до приблизно 1,0nM, від приблизно 0,10 до приблизно 0,80nM, від приблизно 0,15 до приблизно 0,75nM і від приблизно 0,18 до приблизно 0,72nM. В одному варіанті реалізації афінітет зв'язування складає приблизно від 2nM до 22nM. У деяких варіантах реалізації, афінітет зв'язування становить приблизно 10nM. В інших варіантах реалізації афінітет зв'язування складає менше, ніж приблизно 10nM. В інших варіантах реалізації афінітет зв'язування становить приблизно 0,1nM або приблизно 0,07nM. В інших варіантах реалізації афінітет зв'язування складає менше, ніж приблизно 0,1nM або менше, ніж приблизно 0,07nM. В інших варіантах реалізації афінітет зв'язування приймає будь-які значення, менші, ніж приблизно з наступних: 100nM, приблизно 50nM, приблизно 10nM, приблизно 1nM, приблизно 500pM, приблизно 100pM, або від приблизно 50pM до будь-яких з: приблизно 2pM, приблизно 5pM, приблизно 10pM, приблизно 15pM, приблизно 20pM, або приблизно 40pM. У деяких варіантах реалізації афінітет зв'язування приймає будь-яке значення з приблизно 100nM, приблизно 50nM, приблизно 10nM, приблизно 1nM, приблизно 500pM, приблизно 100pM, або від приблизно 50pM, або менше, ніж приблизно 50pM. У деяких варіантах реалізації афінітет зв'язування приймає будь-які значення, менші, ніж приблизно менше, ніж будь-який з приблизно 100nM, приблизно 50nM, приблизно 10nM, приблизно 1nM, приблизно 500pM, приблизно 100pM, або приблизно 50pM. В інших варіантах

реалізації афінитет зв'язування становить приблизно 2пМ, приблизно 5пМ, приблизно 10пМ, приблизно 15пМ, приблизно 20пМ, приблизно 40пМ або більше, ніж приблизно 40пМ. Як добре відомо в даній галузі, афінитет зв'язування можна виразити у вигляді K_D , або константи дисоціації, при цьому зростання афінитету зв'язування відповідає зменшенню K_D . Афінитет зв'язування мишачого моноклонального антитіла 911 проти NGF (Hongo et al., Hybridoma 19: 215-227 (2000)) з людським NGF становить приблизно 10нМ, а афінитет зв'язування гуманізованого антитіла E3 проти NGF (описаний тут) з людським NGF становить приблизно 0,07нМ.

Антагоніст NGF можна ввести перед, під час і/або після операції, розрізу і/або поранення, які викликають або пов'язані з післяопераційним болем. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF вводять перед операцією, розрізом або нанесенням на рани. Введення антагоніста NGF можна здійснити будь-яким шляхом, відомим в даній галузі, включаючи: перорально, внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньом'язово, внутрішньосерцево, інтраспінально, інтраторакально, внутрішньочеревинно, інтравентрикулярно, сублінгвально, і/або трансдермально. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF являє собою антитіло проти NGF, а введення здійснюється одним або декількома з наступних шляхів: внутрішньовенно, підшкірно, за допомогою інгаляції, внутрішньоартеріально, внутрішньом'язово, внутрішньосерцево, інтравентрикулярно і внутрішньочеревинно. Введення може бути системним, наприклад, внутрішньовенним або локалізованим.

У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF вводять у дозі приблизно від 0,1 до 10мг/кг маси тіла, а в інших варіантах реалізації антагоніст NGF вводять у дозі приблизно від 0,3 до 2,0мг/кг маси тіла.

В іншому аспекті винахід надає композицію для лікування і/або запобігання післяопераційного болю, що містить ефективну кількість антагоніста фактора росту нервів (NGF) в комбінації з одним або декількома фармацевтично прийнятними ексципієнтами. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF являє собою антитіло, яке специфічно зв'язується з молекулою NGF. В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF являє собою будь-який антагоніст, що згадується в даному описі.

В іншому аспекті винахід надає набір для використання в будь-якому з описаних тут способів. У деяких варіантах реалізації набір містить будь-який з описаних в даному описі антагоністів NGF у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм. В іншому варіанті реалізації набір додатково містить інструкції по застосуванню антагоніста NGF в будь-якому з описаних у даному описі способів.

Фіг.1 являє собою графік, що відображає оцінку кумулятивного болю в спокої, за даними за 24год. до операції («початковий рівень»), через 2год. після операції («після операції») і через 1 та 2 дні після операції. «Контроль» відноситься до лікування антитілом проти NGF, а «911» відноситься до тварин, що отримували лікування антитілом 911 проти NGF у дозі 35мг/мг (що також на-

зивається "MAb 911") (Hongo et al., Hybridoma 19: 215-227 (2000)). Лікування антитілом проти NGF значно зменшувало післяопераційний біль у спокої.

Фіг.2 являє собою графік, що відображає оцінку термічного болю (гіпералгезії) за даними за 24год. до операції («початковий рівень»), через 4год. після операції («після операції») і через 1 та 2 дні після операції. «Контроль» відноситься до лікування антитілом проти NGF, а «911» відноситься до тварин, що отримували лікування антитілом 911 проти NGF у дозі 35мг/мг. Лікування антитілом проти NGF значно зменшувало післяопераційну термічну гіпералгезію.

Фіг.3 являє собою графік, що відображає оцінку механічного болю (гіпералгезії) у відповідь на механічну стимуляцію, за даними за 24год. до операції («початковий рівень»), через 3год. після операції («після операції») і через 1, 2 і 3 дні після операції. «Контроль» відноситься до лікування антитілом проти NGF, а «911» відноситься до тварин, що отримували лікування антитілом 911 проти NGF. Лікування антитілом проти NGF у дозі 7мг/мг зменшувало механічно викликаний післяопераційний біль.

Фіг.4 являє собою графік, що відображає оцінку болю у спокої, за даними через 24год. після операції, і що показує, що лікування гуманізованим антитілом E3 проти NGF у дозі 0,02мг/мг, 0,1мг/кг, 0,6мг/кг або 1мг/кг зменшувало біль. «*» вказує на статистично велику відмінність ($p < 0,5$) від негативного контролю.

Фіг.5 являє собою графік, що відображає оцінку болю у спокої, за даними через 24год. після операції, і показує, що лікування гуманізованим антитілом E3 проти NGF у дозі 0,5мг/кг значно ($p < 0,005$) зменшувало біль у спокої при ін'єкції через 2год. після операції.

Фіг.6 являє собою графік, що відображає оцінку болю у спокої, за даними через 24год. після операції, і що показує, що лікування антитілом 911 проти NGF в дозі 5мг/кг значно ($p < 0,02$) зменшувало біль у спокої при ін'єкції за 14 днів до операції.

Фіг.7 являє собою графік, що відображає оцінку болю у спокої, за даними через 24год. після операції, і що показує, що лікування антитілом 911 проти NGF в дозі 5мг/кг зменшувало біль у спокої при ін'єкції за 21 день до операції.

Фіг.8 являє собою графік, що відображає оцінку ділянок інтактних ран, після розрізу та лікування сольовим розчином, антитілом 911 проти NGF у дозі 1мг/кг або позитивним контролем-кеторолаком. Ділянки інтактних ран після лікування антитілом 911 проти NGF не відрізнялися від ділянок інтактних ран після лікування сольовим розчином (негативний контроль). Таким чином, лікування антитілом 911 проти NGF не виявляло впливу на загоєння ран. Навпаки, у тварин, що отримували лікування NSAID кеторолаком (позитивний контроль), виявилось значне зменшення ділянок інтактних ран.

Фіг.9 являє собою графік, що демонструє, що лікування низькомолекулярним антагоністом NGF, K252a, значно ($p < 0,005$) зменшувало біль у спокої

після операції при оцінці через 3 год. ("3H-P-tmt") після лікування K252a. "1H-P-tmt" відноситься до 1 год. після лікування K252a.

Фіг.10 являє собою графік, що відображає порівняння лікування антитілом 911 проти NGF і лікування підібраним за ізотипом контрольним антитілом. У тварин, що отримували лікування 1мг/кг антитіла проти NGF (911), виявилось велике зменшення болю у спокої ($p < 0,05$). Навпаки, у тварин, що отримували лікування 1мг/кг підбраного за ізотипом контрольного антитіла до білка дрозодіфили, що викликає амнезію, виявлялися нормальні рівні болю у спокої. Даний експеримент продемонстрував, що знеболюючий ефект антитіла проти NGF був специфічним.

Даний винахід ґрунтується на виявленні того факту, що введення *in vivo* терапевтично ефективної кількості антагоніста NGF, такого як моноклональне антитіло проти NGF можна використати для запобігання і/або лікування післяопераційного болю. Раніше післяопераційний біль лікували високими дозами опіоїдних анальгетиків. Ці засоби викликають небажані побічні ефекти, такі як знижена моторика шлунка, седативний ефект, пригнічення дихання та ниркова коліка. Інші знеболюючі засоби, такі як NSAID, були відносно неефективні при лікуванні цього типу болю. Крім того, відомо, що деякі NSAID інгібують загоєння ран.

Винахід включає способи запобігання або лікування післяопераційного болю в індивідуума (включаючи ссавця, як людину, так і не людину) введенням ефективної кількості антагоніста NGF, такого як антитіло проти NGF, наприклад, моноклонального антитіла проти людського NGF (анти-hNGF).

В іншому аспекті винахід надає способи поліпшення, затримки розвитку і/або запобігання прогресуванню післяопераційного болю, що включають введення ефективної кількості антагоніста NGF індивідууму.

У деяких варіантах реалізації біль у спокої пригнічується, полегшується і/або запобігається, а в деяких варіантах реалізації механічно викликаний біль (такий як біль в результаті руху або іншої механічної або тактильної стимуляції) пригнічується, полегшується і/або запобігається. У деяких варіантах реалізації термічно викликаний біль пригнічується, полегшується і/або запобігається. У деяких варіантах реалізації механічно викликаний біль пригнічується, полегшується і/або запобігається введенням антитіла проти NGF. У деяких варіантах реалізації біль у спокої пригнічується, полегшується і/або запобігається введенням антитіла проти NGF. У деяких варіантах реалізації термічно викликаний біль пригнічується, полегшується і/або запобігається введенням антитіла проти NGF. У деяких варіантах реалізації алодинія пригнічується, полегшується і/або запобігається, а в деяких варіантах реалізації гіпералгезія пригнічується, полегшується і/або запобігається. У ще одних варіантах реалізації алодинія і/або гіпералгезія є термічною або механічною (тактильною) за природою, або болем у спокої. У деяких варіантах реалізації біль являє собою хронічний біль. В інших варіантах реалізації біль пов'язаний з ділян-

кою розрізу, рани або травм і/або ділянкою, розташованою близько до ділянки розрізу, рани і/або травм, у ньому або біля нього.

Винахід також включає композиції і набори для лікування післяопераційного болю, що містять антагоніст NGF, такий як антитіло проти NGF, наприклад, моноклональне антитіло проти NGF, для застосування в будь-якому зі способів, представлених в даному описі. У деяких варіантах реалізації антитіло проти NGF здатне ефективно інгібувати зв'язування NGF з його рецепторами TrkA і/або p75 і/або ефективно інгібувати активацію NGF його рецепторів TrkA і/або p75.

Загальні методики

За відсутності інших вказівок, в практиці даного винаходу будуть використовуватися звичайні методики молекулярної біології (включаючи рекомбінантні методики), мікробіології, клітинної біології, біохімії та імунології, які знаходяться в межах даної галузі. Такі методики повністю пояснюються в літературі, наприклад 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., 1993-8) 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 (P.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).

Визначення

«Антитіло» (взаємозамінно використовуване у формі множини) являє собою молекулу імуноглобуліну, здатну специфічно зв'язуватися з мішенню, такою як вуглеводень, полінуклеотид, ліпід, поліпептид тощо, за допомогою, щонайменше, одного сайту розпізнавання антигену, розташованого у варіабельній ділянці молекули імуноглобуліну. Термін, що використовується в даному описі, охоплює не тільки інтактні або моноклональні антитіла, але також їх фрагменти (такі як Fab, Fab¹, F(ab')₂, Fv), одиночний ланцюг (ScFv), їх мутанти, злиті білки, що включають частину антитіла, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, діатіла, лінійні антитіла, одностанцюгові антитіла, мультиспецифі-

чні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) і будь-яку іншу модифіковану конфігурацію молекули імуноглобуліну, яка включає сайт розпізнавання антигену необхідної специфічності. Антитіло включає антитіло будь-якого класу, такого як IgG, IgA, або IgM (або їх підкласу), крім того, антитіло може не належати до будь-якого певного класу. У залежності від амінокислотної послідовності константного домену їх важких ланцюгів, імуноглобуліни можуть бути віднесені до різних класів. Існують 5 основних класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і декілька з них можна, крім того, розділити на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 та IgA2. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобулінів, називаються відповідно альфа, дельта, іпсилон, гамма та мію. Структури субодиниць і тривимірні конфігурації різних класів імуноглобулінів добре відомі.

«Моноклональне антитіло» відноситься до однорідної популяції антитіл, в якій моноклональне антитіло складається з амінокислот (таких, що зустрічаються або не зустрічаються в природних умовах), які беруть участь у вибіркового зв'язуванні антигену. Популяція моноклональних антитіл високо специфічна, будучи направленою проти єдиного антигенного сайту. Термін «моноклональне антитіло» охоплює не тільки інтактні моноклональні антитіла та моноклональні антитіла повної довжини, але також їх фрагменти (такі як Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одиночний ланцюг (ScFv), їх мутанти, злиті білки, що включають частину антитіла, гуманізовані моноклональні антитіла, химерні моноклональні антитіла і будь-яку іншу модифіковану конфігурацію молекули імуноглобуліну, яка включає сайт розпізнавання антигену необхідної специфічності та здатна зв'язуватися з антигеном. Не передбачається будь-яких обмежень відносно джерела антитіла або способу, яким воно виготовлено (наприклад, гібридомою, фаговим відбором, рекомбінантною експресією, трансгенними тваринами тощо).

«Гуманізовані» антитіла відносяться до молекули, що має антигензв'язувальний сайт, яка по суті отримана з імуноглобуліну від представників видів, відмінних від людини, при цьому інша імуноглобулінова структура молекули основана на структурі і/або послідовності людського імуноглобуліну. Сайт зв'язування антигену може включати або повні варіабельні домени, злиті в константні домени, або тільки ділянки, що визначають комплементарність, (CDR), пересаджені до відповідних каркасних ділянок у варіабельних доменах. Сайти, що зв'язують антиген, можуть бути дикого типу або модифіковані заміщеннями однієї або декількох амінокислот, наприклад, модифіковані для більш близької відповідності людському імуноглобуліну. Деякі форми гуманізованих антитіл зберігають усі послідовності CDR (наприклад, гуманізоване мишаче антитіло, яке містить усі 6 CDR з мишачих антитіл). Інші форми гуманізованих антитіл мають один або декілька CDR (1, 2, 3, 4, 5, 6), які змінені відносно первинного антитіла. У деяких випадках, залишки каркасної ділянки (FR) або інші залишки людського імуноглобуліну заміщені відповідними

не людськими залишками. Крім того, гуманізовані антитіла можуть включати залишки, які не виявляються у реципієнтному антитілі або в донорському антитілі.

Термін «фактор росту нервів» і «NGF», що використовується в даному описі, відноситься до фактора росту нервів і його варіантів, які зберігають, щонайменше, частину активності NGF. Термін «NGF», що використовується в даному описі, включає нативну послідовність NGF будь-яких видів ссавців, включаючи людину, собаку, кішку, коня або корову.

Термін «рецептор NGF» відноситься до поліпептиду, який зв'язується або активується NGF. Рецептори NGF включають рецептор TrkA і рецептор p75 будь-якого виду ссавців, включаючи, але не обмежуючись, людину, собаку, кішку, коня або корову.

Термін «антагоніст NGF» відноситься до будь-якої молекули, яка блокує, пригнічує або зменшує (включаючи значно) біологічну активність NGF, включаючи низхідні шляхи передачі сигналів, опосередковані NGF, такі як зв'язування з рецепторами, і/або викликана клітинна реакція на NGF. Під терміном «антагоніст» мається на увазі відсутність будь-якого специфічного механізму біологічної дії, і вважається, що він безперечно включає і охоплює всі можливі фармакологічні, фізіологічні та біохімічні взаємодії з NGF, прямі або непрямі, або взаємодію з NGF, його рецептором або за допомогою іншого механізму, і його наслідки, яких можна досягнути використанням різних і хімічно різноманітних композицій. Ілюстративні антагоністи NGF включають, але не обмежуються ними, антитіло проти NGF, антисмисловою молекулою, направленою на NGF (включаючи антисмисловою молекулою, направленою на нуклеїнову кислоту, що кодує NGF), сполуку, що інгібує NGF, структурний аналог NGF, домінантно-негативну мутацію рецептора TrkA, який зв'язує NGF, імуноадгезин TrkA, антитіло проти TrkA, антитіло проти p-75 та інгібітор кінази. В цілях даного винаходу, слід ясно розуміти, що термін «антагоніст» охоплює всі раніше ідентифіковані терміни, назви і функціональні стани і характеристики, за допомогою яких сам NGF, біологічна активність NGF (включаючи, але не обмежуючись, його здатність опосередковувати будь-який аспект болю), або наслідки вияву його біологічної активності, по суті зводяться до нуля, зменшуються або нейтралізуються будь-якою значною мірою. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF (наприклад, антитіло) зв'язує (фізично взаємодіє з) NGF, зв'язується з рецептором NGF (таким як рецептор TrkA, і/або рецептор p-75), знижує (гальмує і/або блокує) низхідну передачу сигналів рецептора NGF, і/або інгібує (знижує) синтез, продукцію і вивільнення NGF. В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF зв'язує NGF і запобігає димеризації рецептора TrkA і/або аутофосфорилуванню TrkA. В інших варіантах реалізації антагоніст NGF інгібує або знижує синтез і/або продукцію (вивільнення) NGF. Приклади типів антагоністів NGF надані в даному описі.

Термін «антитіло проти NGF», що використовується в даному описі, відноситься до антитіла,

яке здатне зв'язуватися з NGF, та інгібувати біологічну активність NGF і/або низхідний шлях (шляхи), опосередковані передачею сигналів NGF.

«Імуноадгезин TrkA» відноситься до розчинної химерної молекули, що включає фрагмент рецептора TrkA, наприклад, позаклітинний домен рецептора TrkA і послідовність імуноглобуліну, яка зберігає специфічність зв'язування рецептора TrkA.

«Біологічна активність» NGF загалом відноситься до здатності зв'язувати рецептори NGF і/або активувати шляхи передачі сигналів рецепторів NGF. Без обмеження, біологічна активність включає будь-який з наступних: здатність зв'язувати рецептори NGF (такі як p75 і/або TrkA); здатність сприяти димеризації і/або аутофосфорилуванню рецептора TrkA; здатність активувати шляхи передачі сигналів рецепторів NGF; здатність сприяти диференціюванню, проліферації, виживанню, зростанню клітин та іншим змінам клітинної фізіології, включаючи (у випадку нейронів, включаючи периферичні та центральні нейрони) зміну морфології нейронів, синаптогенез, синаптичну функцію, вивільнення нейромедiatorів і/або нейропептидів і регенерацію після пошкодження; і здатність опосередковувати післяопераційний біль.

Термін «епітоп» використовується для позначення сайтів зв'язування (моноклональних або поліклональних) антитіл на білкових антигенах.

Термін «лікування», що використовується в даному описі, являє собою підхід для отримання сприятливого або бажаного клінічного результату. Для даного винаходу, сприятливі або бажані клінічні результати включають, але не обмежуються, одним або декількома з наступних: зменшення або полегшення будь-якого аспекту болю, зокрема, зменшення тяжкості, полегшення одного або декількох симптомів, пов'язаних з післяопераційним болем, включаючи будь-який аспект післяопераційного болю (наприклад, скорочення тривалості болю, і/або зменшення больової чутливості і/або больових відчуттів).

«Ефективна кількість» являє собою кількість, достатню для досягнення сприятливих або бажаних клінічних результатів, включаючи полегшення або зменшення болю. Для даного винаходу, ефективна кількість антагоніста NGF являє собою кількість, достатню для лікування, полегшення, зменшення інтенсивності або запобігання післяопераційному болю. У деяких варіантах реалізації «ефективна кількість» може зменшити біль у спокої (біль у спокійному стані) або механічно викликаний біль (включаючи біль після руху або обидва види болю), і його можна вводити перед, під час і/або після надрізу розрізу, розриву або травми. У деяких варіантах реалізації «ефективна кількість» являє собою кількість, достатню для затримки розвитку післяопераційного болю.

«Зниження виникнення» болю означає будь-яке зменшення сили (яке може включати зниження потреби і/або кількості (наприклад, підданість впливу) інших препаратів і/або видів лікування, загалом таких, що використовуються з приводу даного стану, включаючи, наприклад, опіати), тривалості і/або частот (включаючи, наприклад, за-

тримку або збільшення часу до виникнення післяопераційного болю в індивідуума). Як зрозуміло фахівцям в даній галузі, індивідууми можуть варіюватися з точки зору їх реакції на лікування, і тому, по суті, наприклад, «спосіб зниження частоти післяопераційного болю в індивідуума» відображає введення описаного в даному описі антагоніста NGF на основі обґрунтованого очікування, що таке введення може, ймовірно, спричинити таке зниження частоти у даного конкретного індивідуума.

«Полегшення» післяопераційного болю або одного або декількох симптомів післяопераційного болю означає зменшення або послаблення одного або декількох симптомів післяопераційного болю, в порівнянні з ситуацією без введення антагоніста NGF. «Полегшення» також включає скорочення або зменшення тривалості симптому.

«Послаблення» післяопераційного болю або одного або декількох симптомів післяопераційного болю означає зменшення міри одного або декількох небажаних клінічних виявів післяопераційного болю в індивідуума або популяції індивідуумів, що одержують лікування антагоністом NGF відповідно до винаходу.

Термін «затримка» розвитку післяопераційного болю, що використовується в даному описі, означає відкладати, перешкоджати, сповільнювати, затримувати, стабілізувати і/або відстрочити прогресування післяопераційного болю. Дана затримка може мати різну тривалість у часі, в залежності від анамнезу захворювання і/або індивідуумів, що піддаються лікуванню. Як очевидно для фахівця в даній галузі, достатня або значна затримка може, по суті, охоплювати запобігання у тому смислі, що в індивідуума не розвинеться післяопераційний біль. Спосіб, який «затримує» розвиток симптому, являє собою спосіб, який знижує ймовірність розвитку симптому в даних часових рамках, і/або знижує міру симптомів в даній часовій рамці, в порівнянні з випадками, коли спосіб не використовується. Такі порівняння зазвичай основані на клінічних дослідженнях з використанням статистично значущої кількості індивідуумів.

«Розвиток» або «прогресування» післяопераційного болю означає первинні вияви і/або подальше прогресування розладу. Розвиток післяопераційного болю можна виявити і оцінити з використанням стандартних клінічних методик, що добре відомо в даній галузі. Однак, розвиток також відноситься до прогресування, яке може бути таким, що не виявляється. Для даного винаходу, розвиток або прогресування відноситься до біологічного перебігу симптомів. «Розвиток» включає виникнення, рецидив і початок. Термін «початок» або «виникнення» післяопераційного болю, що використовується в даному описі, включає первинну появу і/або рецидив.

«Індивідуум» являє собою хребетне, переважно, ссавця, переважніше, людину. Ссавці включають, але не обмежуються, сільськогосподарських тварин, спортивних тварин, домашніх тварин, приматів, коней, корів, собак, кішок, мишей і щурів.

«Післяопераційний біль» (що взаємозамінно іменується «болем після розрізу» або «посттрав-

матичним болем») відноситься до болю, що виникає і викликається зовнішньою травмою, такою як розріз, прокол, надріз, розрив або рана тканин індивідуума (включаючи біль, який виникає внаслідок хірургічних процедур, інвазивних або неінвазивних). Термін «післяопераційний біль», що використовується в даному описі, не включає біль, який виникає без зовнішньої фізичної травми. У деяких варіантах реалізації післяопераційний біль являє собою внутрішній або зовнішній біль, і рана, розріз, травма, розрив або надріз можуть виникнути випадково (як при травматичній рані) або навмисно (як при хірургічному розрізі). Термін «біль», що використовується в даному описі, включає сприйняття болю і відчуття болю, і біль може бути оцінений об'єктивно і суб'єктивно, з використанням бальних оцінок болю і інших способів, добре відомих в даній галузі. Термін «післяопераційний біль», що використовується в даному описі, включає алодинію (тобто, підвищену реакцію на зазвичай не больовий стимул) і гіпералгезію (тобто, підвищену реакцію на зазвичай больовий або неприємний стимул), який може бути, в свою чергу, тепловим або механічним (тактильним) за природою. У деяких варіантах реалізації біль характеризується тепловою чутливістю, механічною чутливістю і/або болем у спокої. У деяких варіантах реалізації післяопераційний біль включає механічно викликаний біль або біль у спокої. В інших варіантах реалізації післяопераційний біль включає біль у спокої. Біль може являти собою первинний або вторинний біль, як добре відомо в даній галузі.

«Біль у спокої» відноситься до болю, що виникає в той час як індивідуум знаходиться в спокої, на відміну, наприклад, від болю, що виникає, коли індивідуум рухається або зазнає інших механічних стимулів (наприклад, поштовхів або штурхань).

«Механічно викликаний біль» (взаємозамінно іменується механосенсорним болем) відноситься до болю, що викликаний механічним стимулом, таким як прикладання маси до поверхні, тактильний стимул і стимуляція, викликана або пов'язана з рухом (включаючи кашель, зміщення ваги тощо).

Відновлення після операції, травми або рани «посилюється», коли аспект відновлення після операції, травми або рани поліпшується (у порівнянні з відновленням після операції, травми або рани без введення антагоніста NGF). Наприклад, присутність і/або інтенсивність небажаних побічних ефектів (таких як побічні ефекти, пов'язані із застосуванням звичайних знеболюючих засобів (наприклад, опіоїдів) може бути зменшена і/або усунена в присутності антагоніста NGF відносно присутності і/або інтенсивності таких побічних ефектів за відсутності антагоніста NGF. На це посилення вказує введення антагоніста NGF, і воно не повинно означати, що таке порівняння (введення антагоніста NGF в порівнянні з відсутністю введення) повинно проводитися і бути доведене відносно будь-якого даного індивідуума.

Способи за винаходом

Відносно всіх описаних в даному описі способів, посилення на антагоніст NGF також включає композиції, що включають один або декілька вка-

заних засобів. Ці композиції можуть, крім того, включати відповідні ексципієнти, такі як фармацевтично прийнятні ексципієнти (носії), включаючи буфери, які добре відомі в даній галузі. Даний винахід можна використовувати окремо або в комбінації з іншими звичайними способами лікування.

Способи запобігання або лікування післяопераційного болю

Даний винахід можна використовувати для лікування, затримки розвитку і/або запобігання післяопераційному болю у індивідуумів, включаючи всіх ссавців, як людини, так і відмінних від людини. Крім того, даний винахід можна використовувати у індивідуумів, що мають різану рану тканин, розріз, прокол або розрив, або внутрішній, або зовнішній. Така різана рана може виникнути випадково, як при травматичній рані, або умисно, як при операції.

Відповідно, в одному аспекті винахід включає способи лікування післяопераційного болю у індивідуума, що передбачають введення ефективної кількості антагоніста NGF, такого як антитіло проти NGF. У деяких варіантах реалізації післяопераційний біль включає одну або декілька з наступних: алодинія, гіпералгезія, механічно викликаний біль, термічно викликаний біль, або біль у спокої. У деяких варіантах реалізації післяопераційний біль включає механічно викликаний біль і/або болі у спокої. Наприклад виявлено, що антитіла проти NGF полегшують обидва вказаних аспекти. В інших варіантах реалізації післяопераційний біль включає біль у спокої. Біль може являти собою первинний і/або вторинний біль. В інших варіантах реалізації алодинія пригнічується, полегшується і/або запобігається, а в деяких варіантах реалізації гіпералгезія пригнічується, полегшується і/або запобігається. У ще одних варіантах реалізації алодинія і/або гіпералгезія є термічною або механічною (тактильною) за природою (або обома) або болем у спокої. У деяких варіантах реалізації біль являє собою хронічний біль. В інших варіантах реалізації біль локалізується поблизу і/або біля одного або декількох ділянок розрізу, рани або травми.

В іншому аспекті винахід включає способи запобігання, полегшення і/або запобігання розвитку або прогресування післяопераційного болю.

У деяких варіантах реалізації антагоніст MGF, такий як антитіло проти NGF, вводять перед операцією (в деяких варіантах реалізації, перед тим як активність, ймовірно, приведе до зовнішньої травми і/або рани). Наприклад, антагоніст NGF можна ввести за 30хв., 1год., 5год., 10год., 15год., 24год. або навіть більше, наприклад за 1 день, декілька днів або навіть за 1тиж., 2тиж., 3тиж. або більше перед активністю з ризиком травми, рани або розрізу, або перед операцією (у деяких варіантах реалізації, ймовірно, приведуть до травм, рани або розрізу). В інших варіантах реалізації антагоніст NGF вводиться під час і/або після операції або активності, яка, ймовірно, приведе до зовнішньої травми або рани. В одному варіанті реалізації антагоніст NGF вводиться через 1год., 2год., 3год., 4год., 6год., 8год., 12год., 24год., 30год., 36год. або більше після операції, рани або травми.

В іншому аспекті винахід включає способи підвищення больового порогу. Термін «підвищення больового порогу», що використовується тут, відноситься до зниження, зменшення і/або мінімізації болю, пов'язаної з операцією, розрізом, травмою або раною (включаючи знижене, зменшене і/або мінімізоване суб'єктивне сприйняття болю).

У ще одному аспекті винахід включає способи посилення відновлення після операції (а також посилення відновлення після рани, травматичного пошкодження і/або розрізу).

Зрозуміло, що хоча в даному описі посилення загалом робиться на лікування або запобігання післяопераційному болю, антагоніст NGF можна ввести перед явищем або станом (станами) з ризиком зовнішньої травми (такої як удар), який зріс, пошкодження або рани. Як зрозуміло фахівцям в даній галузі, явище або стан з ризиком зовнішньої травми, який зріс, пошкодження або рани охоплює роботу з небезпечних професій, бойові дії і/або заняття спортом.

Діагностика або оцінка болю добре встановлена в даній галузі. Оцінку можна виконати на основі об'єктивного показника, такого як спостереження поведінки, такої як реакція на стимули, вираз обличчя тощо. Оцінка може також ґрунтуватися на суб'єктивних показниках, таких як характеристика болю пацієнтом з використанням різних шкал болю (див., наприклад, Katz et al., Surg Clin North Am. (1999) 79 (2): 231-52; Caraceni et al., J. Pain Symptom Manage (2002) 23 (3): 239-55).

Полегшення болю може характеризуватися динамікою полегшення у часі. Відповідно, в деяких варіантах реалізації полегшення болю спостерігається суб'єктивно або об'єктивно через 1, 2 або декілька годин (а в деяких варіантах реалізації досягає максимуму приблизно через 12-18 год.). В іншому варіанті реалізації полегшення болю спостерігається суб'єктивно або об'єктивно через 24, 36, 48, 60, 72 або більше години після операції (або явища, пов'язаного з раною або травмою).

Антагоністи NGF

У способах за винаходом застосовується антагоніст NGF, який може являти собою будь-яку молекулу, яка блокує, пригнічує або зменшує (включаючи значно) біологічну активність NGF, включаючи низхідні шляхи, опосередковані передачею сигналів NGF, такі як зв'язування рецепторів і/або викликану клітинну реакцію на NGF. Термін «антагоніст» не має на увазі ніякого специфічного механізму біологічної дії, і він призначений для ясного включення і охоплення всіх можливих фармакологічних, фізіологічних і біохімічних взаємодій з NGF і його наслідків, які можуть досягатися різноманітними різними і хімічно багатоманітними композиціями. Ілюстративні антагоністи NGF включають, але не обмежуються, антитіло проти NGF, антисмислову молекулу, направлену на NGF (включаючи антисмислову молекулу, направлену на нуклеїнову кислоту, що кодує NGF), антисмислову молекулу, направлену на рецептор NGF (такий як рецептор TrkA і/або рецептор p75) (включаючи антисмислову молекулу, направлену на нуклеїнову кислоту, що кодує TrkA і/або p75), сполуку, що інгібує NGF, структур-

ний аналог NGF, домінантно-негативну мутацію рецептора TrkA, який зв'язує NGF, імуоадгезин TrkA, антитіло проти TrkA, антитіло проти p75 і інгібітор кінази. Для вирішення задач даного винаходу, потрібно ясно розуміти, що термін «антагоніст» охоплює всі раніше ідентифіковані терміни, назви і функціональні стани і характеристики, за допомогою яких сам NGF, біологічна активність NGF (включаючи, але не обмежуючись, його здатність опосередковувати будь-який аспект болю), або наслідки реалізації біологічної активності, по суті зводяться до нуля, меншають або нейтралізуються будь-якою значною мірою. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF (наприклад, антитіло) зв'язує (фізично взаємодіє з) NGF, зв'язується з рецептором NGF (таким як рецептор TrkA і/або p75), і/або зменшує (гальмує і/або блокує) низхідну передачу сигналів рецептором NGF. Відповідно, в інших варіантах реалізації антагоніст NGF зв'язується (фізично взаємодіє) з рецептором NGF. В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF зв'язується з рецептором NGF (таким як рецептор TrkA і/або p75). В інших варіантах реалізації антагоніст NGF зменшує (гальмує і/або блокує) низхідну передачу сигналів рецептором (наприклад, інгібітори передачі сигналів кінази). В інших варіантах реалізації антагоніст NGF інгібує (знижує) синтез і/або вивільнення NGF. В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF являє собою антагоніст NGF, який не є імуоадгезином TrkA (тобто, відрізняється від імуоадгезину TrkA). В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF відрізняється від антитіла проти NGF. В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF відрізняється від імуоадгезину TrkA і відрізняється від антитіла проти NGF. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF зв'язує NGF (такий як hNGF) і значущо не зв'язується зі спорідненими нейротропінами, такими як NT-3, NT4/5 і/або BDNF. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF не зв'язаний з побічною імунною реакцією. В інших варіантах реалізації антагоніст NGF являє собою антитіло проти NGF. У ще одних варіантах реалізації антитіло проти NGF гуманізовано (таке як описане в даному описі антитіло E3). У деяких варіантах реалізації антитіло проти NGF являє собою антитіло E3 (як описано тут). В інших варіантах реалізації антитіло проти NGF включає один або декілька CDR антитіла E3 (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 або, в деяких варіантах реалізації, усі 6 CDR з E3). В інших варіантах реалізації антитіло є людським. У ще одних варіантах реалізації антитіло проти NGF включає амінокислотну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, показану в таблиці 1 (SEQ ID NO:1) і амінокислотну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, показану в таблиці 2 (SEQ ID NO:2). У ще одних варіантах реалізації антитіло включає модифіковану константну ділянку, таку як константна ділянка, яка є імунологічною інертною, наприклад, не запускає опосередкований комплементом лізис, або не стимулює антитіло-залежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC). В інших варіантах реалізації константна ділянка модифікована, як описано в Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-

2624; заявці PCT №PCT/GB99/01441 і/або в заявці на патент Великобританії №9809951.8.

Антитіла проти NGF

У деяких варіантах реалізації винаходу антагоніст NGF включає антитіло проти NGF. Антитіло проти NGF повинно виявляти будь-яку одну або декілька з наступних характеристик: (а) зв'язування з NGF; (б) інгібування біологічної активності NGF або низхідних шляхів, опосередкованих функцією передачі сигналів NGF; (с) запобігання, полегшення або лікування будь-якого аспекту післяопераційного болю; (д) блокування або зменшення активації рецепторів NGF (включаючи димеризацію і/або аутофосфорилування рецептора TrkA); (е) збільшення виведення NGF; (ф) інгібування (зниження) синтезу, продукції або вивільнення NGF; (г) посилення відновлення після операції, рани або травми.

Антитіла проти NGF відомі в даній галузі (див., наприклад, публікації PCT №WO 01/78698, WO 01/64247, патенти США №№5844092, 5877016 і 6153189; Hongo et al., Hybridoma, 19: 215-227 (2000); Cell. Molec. Biol. 13: 559-568 (1993); GenBank Accession Nos. U39608, U39609, L17078, або L17077).

У деяких варіантах реалізації антитіло проти NGF являє собою гуманізоване мишаче моноклональне антитіло проти NGF, назване антитілом

«Е3», яке включає константну ділянку важкого ланцюга людського IgG2a, що містить наступні мутації: від A330P331 до S330S331 (нумерація амінокислот з посиланням на послідовність IgG2a дикого типу; див. Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624); константну ділянку людського легкого ланцюга капа; і варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюга, показані в таблицях 1 і 2.

Таблиця 1: Варіабельна ділянка важкого ланцюга

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYD
LNWIRQPPG
KGLEWIGIWDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQF
SLKLSSVTAADTAV
YYCARGGYWYATSYFFDYWGQGTLVTVS (SEQ ID NO:1).

Таблиця 2: Варіабельна ділянка легкого ланцюга

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNL
NWWYQQKPG
KAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSL
QPEDIATYYCQQEHT LPYTFGGGTKLEIKRT (SEQ ID NO:2).

Наступні полінуклеотиди, що кодують варіабельну ділянку важкого ланцюга або варіабельну ділянку легкого ланцюга, були депоновані в ATCC (Американську колекцію типових культур) 8 січня 2003р.:

Матеріал		Недоступу ATCC	Дата депонування
Вектор Eb.911.3E	Варіабельна ділянка легкого ланцюга E3	PTA-4893	8 січня 2003р.
Вектор Eb.pur.911.3E	Варіабельна ділянка легкого ланцюга E3	PTA-4894	8 січня 2003р.
Вектор Db.911.3E	Варіабельна ділянка важкого ланцюга E3	PTA-4895	8 січня 2003р.

Вектор Eb.911.3E являє собою полінуклеотид, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга, показану в таблиці 2; вектор Eb.pur.911.3E являє собою полінуклеотид, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга, показану в таблиці 2, і вектор Db.911.3E являє собою полінуклеотид, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга, показану в таблиці 1.

В іншому варіанті реалізації антитіло проти NGF включає один або декілька CDR антитіла E3 (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 або, в деяких варіантах реалізації, усі 6 CDR з E3). Визначення ділянок CDR цілком в компетенції фахівців в даній галузі.

Антитіла, які можна використати в даному винаході, можуть охоплювати моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, фрагменти антитіл (наприклад, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc тощо), химерні антитіла, біспецифічні антитіла, гетерокон'юговані антитіла, одиночний ланцюг (ScFv), їх мутанти, злиті білки, що включають частину антитіла, гуманізовані антитіла і будь-яку іншу модифіковану конфігурацію молекули імуноглобуліну, яка включає сайт розпізнавання антигену необхідної специфічності, включаючи варіанти глікозилювання антитіл, варіанти амінокислотної послідовності антитіл і ковалентно модифіковані антитіла. Антитіла можуть бути мишачого, щурячого, людського або будь-якого іншого походження (включаючи химерні або гуманізовані антитіла). Для даного винаходу, антитіло взаємодіє з NGF таким чином, який інгібує NGF і/або низхідні шляхи, опосередко-

вані функцією передачі сигналів NGF. В одному варіанті реалізації антитіло являє собою людське антитіло, яке розпізнає один або декілька епітопів на людському NGF. В іншому варіанті реалізації антитіло являє собою мишаче або щуряче антитіло, яке розпізнає один або декілька епітопів на людському NGF. В іншому варіанті реалізації антитіло розпізнає один або декілька епітопів на NGF, вибраному з групи, що складається з: NGF приматів, собак, кішок, коней і корів. В інших варіантах реалізації антитіло включає модифіковану константну ділянку, таку як константна ділянка, яка імунологічно інертна, наприклад, не запускає опосередкований комплексом лізис, або не стимулює антитіло-залежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC). Активність ADCC можна оцінити з використанням способів, розкритих в патенті США №5500362. В інших варіантах реалізації константна ділянка модифікована, як описано в Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624; заявці PCT №PCT/GB99/01441 і/або в заявці на патент Великобританії №9809951.8.

Афінітет зв'язування антитіла проти NGF з NGF (таким як hNGF) може складати від приблизно 0,10нМ до приблизно 0,80нМ, від приблизно 0,15 до приблизно 0,75нМ і від приблизно 0,18 до приблизно 0,72нМ. В одному варіанті реалізації афінітет зв'язування складає приблизно від 2пМ до 22пМ. У деяких варіантах реалізації афінітет зв'язування становить приблизно 10нМ.

В інших варіантах реалізації афінітет зв'язування складає менше, ніж приблизно 10нМ. В інших варіантах реалізації афінітет зв'язування становить приблизно 0,1нМ або приблизно 0,07нМ. В інших варіантах реалізації афінітет зв'язування складає менш, ніж приблизно 0,1нМ або менш, ніж приблизно 0,07нМ. В інших варіантах реалізації афінітет зв'язування приймає будь-яке значення з приблизно 100нМ, приблизно 50нМ, приблизно 10нМ, приблизно 1нМ, приблизно 500пМ, приблизно 100пМ, або від приблизно 50пМ до будь-якого з приблизно 2пМ, приблизно 5пМ, приблизно 10пМ, приблизно 15пМ, приблизно 20пМ, або приблизно 40пМ. У деяких варіантах реалізації афінітет зв'язування приймає будь-яке значення з приблизно 100нМ, приблизно 50нМ, приблизно 10нМ, приблизно 1нМ, приблизно 500пМ, приблизно 100пМ, приблизно 50пМ, або менш, ніж приблизно 50пМ. У деяких варіантах реалізації афінітет зв'язування приймає будь-яке значення з менше, ніж приблизно 100нМ, приблизно 50нМ, приблизно 10нМ, приблизно 1нМ, приблизно 500пМ, приблизно 100пМ, приблизно 50пМ. В інших варіантах реалізації афінітет зв'язування становить приблизно 2пМ, приблизно 5пМ, приблизно 10пМ, приблизно 15пМ, приблизно 20пМ, приблизно 40пМ, або більше, ніж приблизно 40пМ.

Одним зі способів визначення афінітету зв'язування антитіл до NGF є вимірювання афінітету зв'язування моноклональних фрагментів Fab антитіла. Для отримання монофункціональних фрагментів Fab антитіло (наприклад, IgG) можна розщепити папаїном або експресувати рекомбінантно. Афінітет фрагмента Fab антитіла проти NGF можна визначити методом поверхневого плазмового резонансу (пристроєм для визначення поверхневого плазмового резонансу (SPR) BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ). Осколки CM5 можна активувати гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Людський NGF (або будь-який інший NGF) можна розвести в 10мМ ацетаті натрію при pH4,0 і ін'єктувати зверх активованого осколка в концентрації 0,005мг/мл. Використовуючи час потоку, що змінюється, через канали окремих осколків, можна досягнути двох діапазонів щільності антигену: 100-200 одиниць реакції (RU) для детальних кінетичних досліджень і 500-600 RU для скринінгових аналізів. Осколки можна блокувати етаноламіном. Дослідження регенерації показали, що суміш елюційного буфера Пірса (продукт №21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) і 4М NaCl (2:1) ефективно видаляє зв'язаний Fab, в той самий час підтримуючи активність hNGF на осколкові протягом більше 200 ін'єкцій. Буфер HBS-EP (0,01 М HEPES, pH7,4, 0,15 NaCl, 3мМ EDTA, 0,005% поверхнево-активних речовини P29) використовують як робочий буфер для аналізів BIAcore. Серійне розведення (за визначенням, K_D складає розведення в 0,1-10 раз) зразків очищеного Fab ін'єктують протягом 1хв. при швидкості 100мкл/хв., і допустимі періоди часу дисоціації до 2год. Величини концентрації білків Fab визначають ELISA і/або електрофорезом SDS-PAGE з викорис-

станням Fab відомої концентрації (за даними визначення амінокислотним аналізом) як стандарт. Швидкості кінетичної асоціації (k_{on}) і швидкості дисоціації (k_{off}) отримують одночасно підгонкою даних до моделі зв'язування Langmuir (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6.99-100) з використанням програми оцінки BIA. Величини константи рівноважної дисоціації (K_D) розраховують як k_{off}/k_{on} . Даний протокол підходить для використання при визначенні афінітету зв'язування антитіла до NGF будь-якого виду, включаючи людський NGF, NGF іншого хребетного (в деяких варіантах ссавця) (наприклад, мишачого NGF, щурячого NGF, NGF приматів), а також для використання з іншими нейротропінами, такими як споріднені нейротропіни NT3, NT4/5 і/або BDNF.

У деяких варіантах реалізації антитіло зв'язує людський NGF і специфічно не зв'язує NGF від інших видів хребетних (в деяких варіантах реалізації ссавця). У деяких варіантах реалізації антитіло зв'язує людський NGF, а також один або декілька NGF від інших видів хребетних (в деяких варіантах реалізації ссавця). У ще одних варіантах реалізації антитіло зв'язує NGF і значущо перехресно не взаємодіє з іншими нейротропінами (такими як споріднені нейротропіни NT3, NT4/5 і/або BDNF). У деяких варіантах реалізації антитіло зв'язує NGF, а також, щонайменше, один інший нейротропін. У деяких варіантах реалізації антитіло зв'язується з NGF виду ссавця, такого як кінь або собака, але значущо не зв'язується з NGF від інших видів ссавців.

Епітоп(и) можуть бути безперервними і переривчастими. В одному варіанті реалізації антитіло зв'язує по суті той самий епітоп hNGF, що і антитіло, вибране з групи, що складається з MAb 911, MAb 912 і MAb 938, як описано в публікації Hongo et al., *Hybridoma*, 19: 215-227 (2000). В іншому варіанті реалізації антитіло зв'язує по суті той самий епітоп hNGF, що і MAb 911. У ще одному варіанті реалізації антитіло зв'язує по суті той самий епітоп hNGF, що і MAb 909 (Hongo et al., вище). Наприклад, епітоп може включати один або декілька з: залишків K32, K34 і E35 в межах варіабельної ділянки 1 (амінокислоти 23-35) hNGF; залишки F79 і T81 у межах варіабельної ділянки 4 (амінокислоти 81-88) hNGF; залишки H84 і K88 в межах варіабельної ділянки 4; залишок R103 між варіабельною ділянкою 5 (амінокислоти 94-98) hNGF і C-кінцем (амінокислоти 111-118) hNGF; залишку E11 в межах преваріабельної ділянки 1 (амінокислоти 10-23) hNGF; Y52 між варіабельною ділянкою 2 (амінокислоти 40-49) hNGF і варіабельною ділянкою 3 (амінокислоти 59-66) hNGF; залишків L112 і S113 в межах C-кінця hNGF; залишків R59 і R69 в межах варіабельної ділянки 3 hNGF; або залишків V18, V20 і G23 в межах преваріабельної ділянки 1 hNGF. Крім того, епітоп може включати одну або декілька з варіабельної ділянки 1, варіабельної ділянки 3, варіабельної ділянки 4, варіабельної ділянки 5, N-кінцевої ділянки і/або C-кінця hNGF. У ще одному варіанті реалізації антитіло значно зменшує доступність для розчинника залишку R103 hNGF. Зрозуміло, що хоч описані вище епі-

топи відносяться до людського NGF, середній фахівець в даній галузі може вистроїти в ряд структури людського NGF відповідно до NGF інших видів і ідентифікувати вірогідні копії вказаних епітопів.

В одному аспекті антитіла (наприклад, людські, гуманізовані, мишачі, химерні), які можуть інгібувати NGF, можна отримати з використанням імуногенів, якими експресують повну довжину або часткову послідовність NGF. В іншому аспекті можна використати імуноген, що включає клітину, яка надмірно експресує NGF. Інший приклад імуногену, який можна використати, являє собою білок NGF, який містить NGF повної довжини або частину білка NGF.

Антитіла проти NGF можна отримати будь-яким способом, відомим в даній галузі. Шлях і схема імунізації тварини-хазяїна загалом відповідають прийнятним і звичайним методикам стимуляції і продукції антитіл, як описано нижче в даному описі. Загальні методики продукції людських і мишачих антитіл відомі в даній галузі і описані в даному описі.

Передбачається, що можна маніпулювати будь-яким ссавцевим індивідом, включаючи людей, отримані у них клітини, що продукують інтерферон, з тим, щоб служити за основу для продукції лінії клітин гібридами ссавця, включаючи людину. Зазвичай тварину-хазяїна інокулюють внутрішньочеревинно, внутрішньом'язово, перорально, підшкірно, внутрішньопідшкірно і/або внутрішньодермально кількістю імуногену, включаючи ту, яка описана в даному описі.

Гібридами можна отримати з лімфоцитів та іморталізованих клітин мієломи з використанням загальної методики гібридизації соматичних клітин (Kohler, B. і Milstein, C. (1975) *Nature* 256: 495-497), або у модифікації (Buck, D. W., et al., *In Vitro*, 18: 377-381 (1982)). Наявні мієломні лінії включаючи, але не обмежуючись, X63-Ад8.653 і лінії з Центра розподілу клітин інституту Солка у Сан Дієго, Каліфорнія, США, можна використати при гібридизації. Загалом, методика включає злиття клітин мієломи та лімфоїдних клітин з використанням агента, що викликає злиття, такого як поліетилеңгліколь, або електричним засобом, добре відомим фахівцям в даній галузі. Після злиття клітини виділяють з середовища злиття і вирощують в селективному ростовому середовищі, такому як гіпоксантин-аміноптерин-тимідинове (HAT) середовище, для усунення негібридизованих материнських клітин. Будь-яке з описаних в даному описі середовищ з додавання сироватки або без неї, можна використати для культивування гібридом, які секретують моноклональні антитіла. Як інша альтернатива методиці злиття клітин, в клітини, іморталізовані EBV (вірусом Епштейна-Барра), можна використати для продукції моноклональних антитіл проти NGF винаходу, що обговорюється. При бажанні, гібридами розмножують і субклонують, і надосадові рідини аналізують для виявлення активності проти імуногену звичайними процедурами імуноаналізу (наприклад, радіоімуноаналізом, ферментним імуноаналізом або флюоресцентним імуноаналізом).

Гібридами, які можна використати як джерело антитіл, охоплюють усі похідні, клітини потомства материнських гібридом, які продукують моноклональні антитіла, специфічні для NGF, або їх частину.

Гібридами, які продукують такі антитіла, можна вирощувати *in vitro* або *in vivo* з використанням відомих процедур. При бажанні, моноклональні антитіла можна виділити з культуральних середовищ або біологічних рідин звичайними процедурами очищення імуноглобуліну, такими як осадження сульфатом амонію, гель-електрофорезом, діалізом, хроматографією та ультрафільтрацією. Небажану активність, у випадку її присутності, можна видалити, наприклад, прогонкою препарату по адсорбенту, виготовленому з імуногену, прикріпленого до твердої фази, та елюванням або вивільненням бажаних антитіл з імуногену. Імунізація тварини-хазяїна людським NGF або фрагментом, що містить амінокислотну послідовність-мішень, кон'юговану з білком, який є імуногенним у видів, що підлягають імунізації, наприклад, гемоціаніном у вигляді замкової щілини-блюдечка, сироватковим альбуміном, бичачим тиреоглобуліном, або інгібітором трипсину соєвих бобів з використанням біфункціонального або дериватизованого агента, наприклад, складного малеїмідбензоїлсульфосукциніміду (кон'югація через залишки цистеїну), N-гідроксисукциніміду (через залишки лізину), глутаральдегіду, бурштинового ангідриду, SOCl_2 , або $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, де R і R_1 являють собою різні алкільні групи, може дати популяцію антитіл (наприклад, моноклональних антитіл).

При бажанні, можна секвенувати антитіло проти NGF, що цікавить (моноклональне або поліклональне), і потім послідовність полінуклеотиду можна клонувати у вектор для експресії або поширення. Послідовність, що кодує антитіло, яке цікавить, можна зберігати у векторі в клітині-хазяїні, і клітину-хазяїна можна потім розмножити та заморозити для майбутнього використання. В альтернативі полінуклеотидну послідовність можна використати для генетичної маніпуляції для «гуманізації» антитіла, або для поліпшення спорідненості або інших характеристик антитіла. Наприклад, константну ділянку можна методами генної інженерії модифікувати для більшої відповідності людським константним ділянкам для уникнення імунної відповіді, якщо антитіло використовується в клінічних випробуваннях і способах лікування у людей. Може бути бажано генетично маніпулювати з послідовністю антитіла для отримання більшої спорідненості з NGF і більшої ефективності при інгібуванні NGF. Фахівцеві в даній галузі повинно бути очевидно, що одну або декілька змін полінуклеотидів можна внести в антитіло проти NGF і все ж зберегти його здатність зв'язування з NGF.

Існують 4 загальних етапи для гуманізації моноклонального антитіла. Вони включають: (1) визначення нуклеотиду та амінокислотної послідовності, що прогнозується, легкого і важкого варіабельних доменів вихідного антитіла; (2) проектування гуманізованого антитіла, тобто, вирішення, яку каркасну ділянку використати під час про-

цесу гуманізації; (3) дійсні методології/методику гуманізації і (4) трансфекцію та експресію гуманізованого антитіла (див., наприклад, патенти США №№4816567, 5807715, 5866692, 6331415, 5530101, 5693761, 5693762, 5585089 і 6180370).

Був описаний ряд молекул «гуманізованого» антитіла, що включають сайт зв'язування антигену, отриманий з не людського імуноглобуліну, включаючи химерні антитіла, що мають ділянки гризунів або модифіковані ділянки гризунів V і їх зв'язані ділянки, що визначають комплементарність (CDR), злиті з константними людськими доменами (див., наприклад, 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) і Brown et al., *Cancer Res.* 47: 3577-3583 (1987)). В інших посиланнях описані CDR гризунів, пересажені в опору каркасну ділянку людини (FR) перед злиттям з відповідним константним доменом людського антитіла (див., наприклад, Riechmann et al. *Nature* 332: 323-327 (1988), Verhoeven et al. *Science* 239: 1534-1536 (1988) і Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986)). В іншому посиланні описані CDR гризунів, що підтримуються рекомбінантно вкритими тонким шаром каркасними ділянками (див., наприклад, Європейську патентну публікацію №519596). Дані «гуманізовані» молекули призначені для мінімізації небажаної імунологічної реакції відносно молекул антилюдського антитіла гризунів, яке обмежує тривалість і ефективність варіантів терапевтичного застосування вказаних частин у людей-реципієнтів. Наприклад, константну ділянку антитіла можна методами генної інженерії модифікувати таким чином, що вона стане імунологічно інертною (наприклад, не запускає лізис комплементу) (див., наприклад, заявку РСТ №PCT/GB99/01441; заявку на патент Великобританії №9809951.8). Інші способи гуманізації антитіл, які можна також використовувати, розкриті в Daugherty et al., *Nucl. Acids Res.* 19: 2471-2476 (1991) і в патентах США №№6180377, 6054297, 5997867, 5866692, 6210671 і 6350861 і в заявці РСТ №WO 01/27160.

У ще одній альтернативі повністю людські антитіла можна отримати використанням мишей, що є в продажу, у яких методами генної інженерії була викликана експресія специфічних білків людського імуноглобуліну. Трансгенних тварин, які призначені для створення більш бажаного (наприклад, повністю людські антитіла) або більш сильної імунної реакції, можна також використати для створення гуманізованих або людських антитіл. Прикладами такої технології є Xenomouse™ від Abgenix, Inc. (Fremont, CA) і HuMAB-Mouse® і TC Mouse™ від Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

В альтернативі, антитіла можуть бути отримані рекомбінантно і експресовані з використанням будь-якого способу, відомого в даній галузі. В іншій альтернативі антитіла можна виготовити рекомбінантно технологією фагового відображення (див., наприклад, патенти США №№5565332, 5580717, 5733743 і 6265150, і Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455 (1994)). Альтернативно, технологію фагового відображення (McCafferty et al., *Nature* 348: 552-553 (1990)) можна використати

для продукції людських антитіл і фрагментів антитіл *in vitro* із репертуарів гена варіабельного (V) домен імуноглобуліну від не імунізованих донорів. У відповідності до даної методики, гени домен V антитіла клонують внутрішньорамково або у головний, або в малий ген білка оболонки нитчастого бактеріофага, такого як M13 або fd, і демонструють у вигляді функціональних фрагментів антитіл на поверхні частинки фага. У зв'язку з тим, що нитчаста частинка містить копію однострочної ДНК геному фага, відбори, які ґрунтуються на функціональних властивостях антитіла, також приводять до відбору гена, що кодує антитіла, який виявляє вказані властивості. Таким чином, фаг імітує деякі з властивостей В клітини. Фагове відображення можна виконати у різних форматах; огляди даних, наприклад, в Johnson, Kevin S. і Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993). Декілька джерел сегментів V гена можна використати для фагового відображення. Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991) виділили різноманітний ряд анти-оксазолонівих антитіл з невеликої випадкової комбінаторної бібліотеки V генів, отриманих із селезінок імунізованих мишей. Можна сконструювати репертуар V генів від імунізованих людей-донорів, і антитіла до ряду різноманітних антигенів (включаючи ауто-антигенні) можна виділити, по суті дотримуючись методик, описаних Mark et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), або Griffith et al., *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). При природній імунній відповіді гени антитіл накопичують мутації з високою швидкістю (соматична гіпермутація). Деякі з введених змін нададуть більш високий афінітет, і В клітини, що демонструють поверхневий імуноглобулін з високим афінітетом, переважно реплікуються та диференціюються під час подальшої провокаційної проби антигеном. Даний природний процес можна імітувати використанням методики, відомої як «ланцюгове перемішування» (Marks, et al., *Bio/Technol.* 10: 779-783 (1992)). В даному способі афінітет «первинних» людських антитіл, отриманих фаговим відображенням, можна поліпшити послідовним заміщенням генів ділянки V важкого і легкого ланцюга репертуарами варіантів (репертуарів) генів домен V, що зустрічаються природно, отриманих в імунізованих донорів. Дана методика забезпечує можливість продукції антитіл і фрагментів антитіл з афінітетом у діапазоні pM-nM. Стратегія виготовлення дуже великих репертуарів антитіла фага (також відомих як «загальні материнські бібліотеки» була описана Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.* 21: 2265-2266 (1993). Перемішування генів можна також використати для отримання людських антитіл з антитіл гризунів, де людське антитіло має афінітети та специфічність, аналогічні вихідному антитілу гризунів. У відповідності до даного способу, який також іменується «епітопним імпринтингом», ген домен V важкого і легкого ланцюга антитілу гризунів, отриманий методикою фагового відображення, заміщують репертуаром генів людського домен V, створюючи химери гризуна-людини. Вибір антигену приводить до виділення людських варіабельних ділянок, здатних відновити сайт, що зв'яже функціональний антиген, тобто, епітоп ке-

рує (вдруковує) вибором партнера. Коли процес повторюється для заміщення домену V гризунів, що залишається, отримують людське антитіло (див. патентну заявку PCT WO 93/06213, опубліковану 1 квітня 1993р.). На відміну від традиційної гуманізації антитіл гризунів трансплантацією CDR, дана методика забезпечує повністю людські антитіла, які не мають каркаса або залишків CDR, що походять від гризунів.

Очевидно, що хоча наведене вище обговорення відноситься до гуманізованих антитіл, обговорені загальні принципи застосовні для виготовлення відповідно до вимог антитіл для використання, наприклад, у собак, кішок, приматів, коней та корів. Крім того, очевидно, що один або більше аспектів описаної в даному описі гуманізації антитіла можна комбінувати, наприклад, пересадкою CDR, мутацією каркаса і мутацією CDR.

Антитіла можна виготовити рекомбінантно спочатку виділенням антитіл і клітин, що продукують антитіла, з тварини-хазяїна, отриманням послідовності гена і використання послідовності гена для рекомбінантної експресії антитіла в клітинах-хазяїнах (наприклад, клітинах CHO). Інший спосіб, який можна використати для експресії послідовності антитіл у рослин (наприклад, тютюну) або трансгенного молока. Були розкриті способи рекомбінантної експресії антитіл в рослинах або молоці (див., наприклад, Peeters, et al., Vaccine 19: 2756 (2001); Lonberg, N. i D. Huszar Int. Rev. Immunol 13: 65 (1995); i Pollock, et al., J. Immunol. Methods 231: 147 (1999)). Способи виготовлення похідних антитіл, наприклад, гуманізованих, одноланцюгових і т. д. відомі в даній галузі.

Імуноаналізи та протоково-цитометричні методики розділення клітин, такі як флюоресцентний метод розділення клітин лімфоцитів (FACS), можна також використати для виділення антитіл, які специфічні для NGF.

Антитіла можуть бути зв'язані з багатьма різними носіями. Носії можуть бути активними і/або інертними. Приклади добре відомих носіїв включають поліпропілен, полістирол, поліетилен, декстран, нейлон, амілази, скло, природні та модифіковані целюлози, поліакриламід, агарози та магнетит. Природа носія може бути або розчинною або нерозчинною в цілях винаходу. Фахівцям в даній галузі будуть відомі інші придатні носії для зв'язування антитіл, або вони зможуть встановити їх, використовуючи звичайне експериментування.

ДНК, що кодує моноклональні антитіла, можна легко виділити і секвенувати з використанням звичайних процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, які здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкий і легкий ланцюги моноклональних антитіл). Клітини гібридоми слугують як переважне джерело такої ДНК. Після виділення ДНК можна помістити в експресуючі вектори (такі як експресуючі вектори, розкриті в публікації PCT WO 87/04462), які потім трансфікують в клітину-хазяїна, таку як клітини E.coli, мавпячі клітини COS, клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO) або клітини мієломи, які інакше не продукують білок імуноглобуліну, для отримання синтезу моноклональних антитіл в рекомбінантних

клітинах-хазяїнах (див., наприклад, публікацію PCT WO 87/04462). ДНК можна також модифікувати, наприклад, заміщенням кодуючої послідовності константних доменів важкого і легкого ланцюга людини замість гомологічних мишачих послідовностей (Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 6851 (1984)), або ковалентним приєднанням до імуноглобуліну, що кодує послідовність усієї або частини кодуючої послідовності для не імуноглобулінового поліпептиду. Таким чином, отримують «хімерні» або «гібридні» антитіла, які мають специфічність зв'язування розкритого в даному описі моноклонального антитіла проти NGF.

Антитіла проти NGF можна охарактеризувати з використанням способів, добре відомих в даній галузі. Наприклад, один спосіб являє собою ідентифікацію епітопу, з яким воно зв'язується, або «картування епітопу». Існує багато способів, відомих в даній галузі, для картування та характеристики локалізації епітопів на білках, включаючи розчинення кристалічної структури комплексу антитіла-антигену, конкурентних аналізів, аналізів експресії фрагментів гена та аналізів на основі синтетичних пептидів, як описано, наприклад, в розділі 11 Harlow i Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (1999). У додатковому прикладі картування епітопу можна використати для визначення послідовності, з якою зв'язується антитіло проти NGF. Картування епітопу є в продажу з багатьох джерел, наприклад, Pepscan Systems (Edelherweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands). Епітоп може являти собою лінійний епітоп, тобто такий, що міститься в одному фрагменті секвенування амінокислот, або конформаційний епітоп, утворений тривимірною взаємодією амінокислот, які необов'язково можуть міститися в одному фрагменті секвенування. Пептиди довжини, що змінюється (наприклад, довжини, щонайменше, 4-6 амінокислот), можна виділити або синтезувати (наприклад, рекомбінантно) і використати для аналізів зв'язування з антитілом проти NGF. В іншому прикладі епітоп, з яким зв'язується антитіло проти NGF, можна визначити при систематичному скринінгу використанням перекриваючих пептидів, отриманих з послідовності NGF, і визначенням зв'язуванням антитіла проти NGF. Відповідно до аналізів експресії фрагментів гена, відкритої рамки зчитування, що кодує NGF, фрагментують або випадково, або специфічними генетичними конструкціями, і визначають реактивність експресованих фрагментів NGF з антитілом, що підлягає тестуванню. Фрагменти генів можна, наприклад, отримати PCR (полімеразною реакцією синтезу ланцюга), а потім транскрибувати і транслювати в білок in vitro в присутності радіоактивних амінокислот. Потім зв'язування антитіла з фрагментами NGF, міченими радіоактивною міткою, визначають імунопреципітацією та гелелектрофорезом. Певні епітопи можна також ідентифікувати використанням великих бібліотек випадкових пептидних послідовностей, що демонструються на поверхні часток фага (бібліотеки фага). Альтернативно, певну бібліотеку фрагментів перекриваючих пептидів можна тестувати на

зв'язування з антитілом, що тестується, в простих аналізах зв'язування. У додатковому прикладі, мутагенез зв'язуючого антигену домену, експерименти обміну доменів і мутагенез скануванням аланіну можна виконати для ідентифікації необхідних залишків, достатніх і/або необхідних для зв'язування епітопу. Наприклад, експерименти обміну доменів можна виконати з використанням мутантного NGF, в якому різні фрагменти поліпептиду NGF були заміщені (обміняні) послідовностями з близько спорідненого, але антигенно відмінного білка (такого як інший член родини нейротропінових білків). Оцінкою зв'язування антитіла з мутантним NGF можна оцінити важливість конкретного фрагмента NGF для зв'язування антитіла.

Ще одним способом, який можна використати для характеристики антитіла проти NGF, є використання конкурентних аналізів з іншими антитілами, які, як відомо, зв'язуються з тим самим антигеном, тобто, різними фрагментами на NGF, для визначення того, чи зв'язується антитіло проти NGF з тим самим епітопом, що і інші антитіла. Конкурентні аналізи добре відомі фахівцям в даній галузі. Приклади антитіл, які можна використати в конкурентних аналізах для даного винаходу, включають MAb 911, 912, 938, як описано в публікації Hongo, et al., *Hybridoma* 19: 215-227(2000).

Інші антагоністи NGF

Можна використати антагоністи NGF, відмінні від антитіл проти NGF. У деяких варіантах реалізації винаходу антагоніст NGF включає, щонайменше, одну антисмислову молекулу, здатну блокувати або зменшувати експресію функціонального NGF. Нуклеотидні послідовності NGF відомі і легко визначаються з публічно доступних баз даних (див., наприклад, Borsani et al., *Nuc. Acids Res.* 1990, 18, 4020; Accession Number NM 002506; Ullrich et al., *Nature* 303: 821-825 (1983)). Звичайною процедурою є отримання молекул антисмислових олігонуклеотидів, які будуть специфічно зв'язувати мРНК NGF без перехресної взаємодії з іншими полінуклеотидами. Ілюстративні сайти націлювання включають, але не обмежуються, ініціюючий кодон, регуляторні ділянки 5', кодуєчу послідовність і не транскрибовану ділянку 3'. У деяких варіантах реалізації олігонуклеотиди мають довжину приблизно від 10 до 100 нуклеотидів, довжину приблизно від 15 до 50 нуклеотидів, довжину приблизно від 18 до 25 нуклеотидів, або більше. Олігонуклеотиди можуть включати модифікації каркаса, такі як, наприклад, фосфортіоатні зв'язки, і модифікації 2-0 цукру, добре відомі в даній галузі. Ілюстративні антисмислові молекули включають антисмислові молекули NGF, описані в публікації США №20010046959; див. також <http://www.mnatec.com/repair.htm>.

В інших варіантах реалізації антагоніст NGF включає, щонайменше, одну антисмислову молекулу, здатну блокувати або зменшувати експресію функціонального рецептора NGF (такого як TrkA і/або p75). Woolf et al., *J. Neurosci* (2001) 21(3): 1047-55; Taglialetela et al., *J Neurochem* (1996) 66 (5):1826-35. Нуклеотидні послідовності TrkA і p75

відомі і легко визначаються з публічно доступних баз даних.

Альтернативно, експресію і/або вивільнення NGF і/або експресію рецептора NGF можна зменшити з використанням способів добре відомих з рівня техніки: руйнування гена, морфоліно олігону-клеотидів, РНК або рибозимів. (див. <http://www.maclester.edu/~montgomery/RNAi.html>; <http://pub32.ezboard.com/fmorpholinosfrm19.showMes sage?topicID=6.topic>; <http://www.highveld.com/ribozyme.html>).

В інших варіантах реалізації, антагоніст NGF включає, щонайменше, одну сполуку, що інгібує NGF. Термін «сполука, що інгібує NGF», яка використовується в даному описі, відноситься до сполуки, відмінної від антитіла проти NGF, яка прямо або опосередковано зменшує, інгібує, нейтралізує або усуває біологічну активність NGF. Сполука, що інгібує NGF, повинна виявляти будь-яку одну або декілька з наступних характеристик: (а) зв'язування з NGF; (b) інгібування біологічної активності NGF або низхідних шляхів, опосередкованих функцією передачі сигналів NGF; (c) запобігання, полегшення або лікування будь-якого аспекту післяопераційного болю; (d) блокування або зменшення активації рецепторів NGF (включаючи димеризацію і/або аутофосфорилування рецептора TrkA); (e) збільшення виведення NGF; (f) інгібування (зниження) синтезу, продукції або вивільнення NGF; (g) посилення відновлення після операції. Ілюстративні сполуки, що інгібують NGF, включають низькомолекулярні інгібітори NGF, описані в публікації США №20010046959; сполуки, які інгібують зв'язування NGF з p75, як описано в публікації PCT №WO 00/69829; сполуки, які інгібують NGF, що зв'язуються з TrkA і/або p75, як описано в публікації №WO 98/17278. Додаткові приклади сполук, що інгібують NGF, включають сполуки, описані в публікаціях PCT №WO 02/17914, WO 02/20479, Патентах США №5342942, 6127401 і 6359130. Ще одними ілюстративними сполуками, що інгібують NGF, є сполуки, які являють собою конкурентні інгібітори NGF (див. патент США №6291247). Крім того, фахівець в даній галузі може отримати інші низькомолекулярні сполуки, що інгібують NGF.

У деяких варіантах реалізації сполуки, що інгібують NGF, зв'язують NGF. Ілюстративні сайти націлювання (зв'язування) включають, але не обмежуються, частину NGF, яка зв'язується з рецептором TrkA і/або p75, і тими частинами NGF, які прилягають до ділянки, що зв'язує рецептор, і які частково відповідальні за правильну тривимірну форму частини, що зв'язує рецептор. В іншому варіанті реалізації сполуки, що інгібують NGF, зв'язують рецептор NGF (такий як TrkA і/або p75) та інгібують біологічну активність NGF. Ілюстративні сайти націлювання включають ті частини TrkA і/або p75, які зв'язуються з NGF.

У варіанті реалізації, що включає маленькі молекули, маленька молекула може мати молекулярну масу приблизно від 100 до 20000 дальтон, від 500 до 15000 дальтон або від 1000 до 10000 дальтон. Бібліотеки маленьких молекул є в продажу. Маленькі молекули можна вводити з використан-

ням будь-якого засобу, відомого в даній галузі, включаючи інгаляційне, внутрішньочеревинне, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, підшкірне, підоболонкове, внутрішньошлуночкове, пероральне, ентеральне, парентеральне, інтраназальне або дермальне введення. Загалом, коли антагоніст NGF являє собою маленьку молекулу, її потрібно вводити в дозуванні від 0,1 до 300мг/кг маси пацієнта, розділеної на 3 або більше доз. Для дорослого пацієнта з нормальною масою тіла можна вводити дозу в діапазоні від 1мг до 5г на 1 дозу.

В інших варіантах реалізації антагоніст NGF включає, щонайменше, один структурний аналог NGF. «Структурні аналоги NGF» в даному винаході відносяться до сполук, які мають таку ж тривимірну структуру, як частина структури NGF, і які зв'язуються з рецептором NGF у фізіологічних умовах *in vitro* та *in vivo*, причому зв'язування, щонайменше, частково інгібує біологічну активність NGF. В одному варіанті реалізації структурний аналог NGF зв'язується з рецептором TrkA і/або p75. Ілюстративні, структурні аналоги NGF включають, але не обмежуються, біциклічні пептиди, описані в публікації PCT №WO 97/15593; біциклічні пептиди, описані в патенті США №6291247; циклічні сполуки, описані в патенті США №6017878, і отримані з NGF пептиди, описані в публікації PCT №WO 89/09225. Відповідні структурні аналоги NGF можуть також бути спроектовані і синтезовані за допомогою молекулярного моделювання зв'язування рецептора NGF, наприклад, способом, описаним у публікації PCT №WO 98/06048. Структурні аналоги NGF можуть являти собою мономері або димери/олігомери в будь-якій бажаній комбінації одних і тих самих або різних структур для отримання поліпшених афінитетів і біологічних ефектів.

В інших варіантах реалізації винахід надає антагоніст NGF, що включає, щонайменше, один домінантно-негативний мутант рецептора TrkA і/або p75. Фахівець в даній галузі може отримати домінантно-негативні мутанти, наприклад, рецептора TrkA, так що рецептор зв'яже NGF, і, отже, буде діяти як «стік» для захоплення NGF. Однак, домінантно-негативні мутанти не будуть мати нормальну біологічну активність рецептора (такого як рецептор TrkA) після зв'язування з NGF. Ілюстративні домінантно-негативні мутанти включають, але не обмежуються, мутанти, описані в наступних посиланнях: 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; i Lamballe et al., EMBO J. 1993, 12, 3083, кожна з яких повністю включена в даний опис як посилання. Домінантно-негативні мутанти можна вводити у формі білка або у формі експресуючого вектора, так що домінантно-негативний мутант (наприклад, мутант рецептор TrkA) експресований *in vivo*. Білок або експресуючий вектор можна ввести з використанням будь-якого засобу, відомого в даній галузі, наприклад шляхом внутрішньочеревинного, внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного, підоболонкового, внутрішньошлуночкового, перорального, ентерального, парентерального, інтра-

назального, дермального або інгаляційного введення. Наприклад, введення експресуючих векторів включає місцеве або системне введення, включаючи ін'єкцію, пероральне введення, введення речовин у вигляді часток за допомогою пневматичної рушніці або введення через катетер і місцеве введення. Фахівець в даній галузі знайомий з введенням експресуючих векторів для отримання експресії екзогенного білка *in vivo* (див., наприклад, патенти США №№6436908, 6413942, 6376471).

Можна також використати націлену доставку терапевтичних композицій, що містять антисмисловий полінуклеотид, експресуючий вектор або субгеномні полінуклеотиди. Методики опосередкованої рецептором доставки ДНК описані, наприклад, в 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. Терапевтичні композиції, що містять полінуклеотид, вводять у діапазоні від приблизно 100нг до приблизно 200мг ДНК для місцевого введення в протоколі генної терапії. У деяких варіантах реалізації концентрація знаходиться в діапазоні від приблизно 500нг до приблизно 50мг, від приблизно 1мкг до приблизно 2мг, від приблизно 5мкг до приблизно 500мкг, і від приблизно 20мкг до приблизно 100мкг або більше ДНК можна також використовувати під час протоколу генної терапії. Терапевтичні полінуклеотиди і поліпептиди даного винаходу можна доставити з використанням носіїв доставки гена. Носій доставки гена може бути вірусного або не вірусного походження (див. в цілому Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1: 51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5: 845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1: 185; i Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6: 148). Експресію таких кодуючих послідовностей можна викликати з використанням ендегенних промоторів і/або підсилювачів ссавцевих або гетерологічних промоторів і/або підсилювачів. Експресія кодуючої послідовності може бути або конститутивною, або регульованою.

Вектори на основі вірусів для доставки бажаного полінуклеотиду та експресії в бажаній клітині добре відомі в даній галузі. Ілюстративні носії на основі вірусів включають, але не обмежуються, рекомбінантні ретровіруси (див., наприклад, публікації PCT №№WO 90/07936, WO 94/03622, WO 93/25698, WO 93/25234, WO 93/11230, WO 93/10218, WO 91/02805; патенти США №№5219740, 4777127; патент Великобританії №2200651 і патент EP №0345242), вектори на основі альфавірусу (наприклад, вектори вірусу Синдбіс, вірус лісу Семліки (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), вірус ріки Росе (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) і вірус венесуельського кінського енцефаліту (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532)) і вектори, зв'язані з аденовірусом (AAV) (див., наприклад, публікації PCT №№WO 94/12649, WO 93/03769, WO 93/19191, WO 94/28938, WO 95/11984 і WO 95/00655). Можна

також використати введення ДНК, зв'язаної з убитим аденовірусом, як описано в публікації Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147.

Можна також використати не вірусні носії і способи доставки, що включають, але що не обмежуються, полікатіонну конденсовану ДНК, зв'язану або не зв'язану з одним убитим аденовірусом (див., наприклад, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147); ДНК, зв'язану з лігандом (див., наприклад, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264: 16985); клітини-носії доставки еукаріотичних клітин (див., наприклад, патент США №5814482; публікації PCT №№WO 95/07994, WO 96/17072, WO 95/30763 і WO 97/42338); і нейтралізацію заряду ядра або злиття з клітинними мембранами. Можна також використати депротейнізовану ДНК. Ілюстративні способи впровадження депротейнізованої ДНК описані в публікації PCT №WO 90/11092 і патенті США №5580859. Ліпосоми, які діють як носії доставки гена, описані в патенті США №5422120; публікації PCT №WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/14445 і патенті EP №0524968. Додаткові підходи описані в Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14: 2411, і в Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91: 1581.

Також очевидно, що експресуючий вектор можна використати для направлення експресії будь-якого з основаних на білку антагоністів NGF, описаних в даному описі (наприклад, антитіла проти NGF, імуоадгезину TrkA тощо). Наприклад, інші фрагменти рецептора TrkA, які здатні блокувати (від часткового до повного блокування) NGF і/або біологічну активність NGF, відомі в даній галузі.

В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF включає, щонайменше, один імуоадгезин TrkA. Термін «імуоадгезини TrkA», що використовується в даному описі, відноситься до розчинних химерних молекул, що включають позаклітинний домен рецептора TrkA і послідовність імуноглобуліну, який зберігає специфічність зв'язування рецептора TrkA (по суті зберігає специфічність зв'язування рецептора TrkA) і здатний зв'язувати NGF.

Імуоадгезини TrkA відомі в даній галузі, і було виявлено, що вони блокують (зменшують або пригнічують) зв'язування NGF з рецептором TrkA (див., наприклад, патент США №6153189). Brennan et al. повідомляють про введення імуоадгезину TrkA на щурячій моделі післяопераційного болю (див. Society for Neuroscience Abstracts 24 (1-2) 880 (1998)). В одному варіанті реалізації імуоадгезин TrkA включає злиття амінокислотної послідовності рецептора TrkA (або її частини) з позаклітинного домену TrkA, здатної зв'язувати NGF (в деяких варіантах реалізації амінокислотної послідовності, яка по суті зберігає специфічність зв'язування рецептора TrkA) і послідовності імуноглобуліну. У деяких варіантах реалізації рецептор TrkA являє собою послідовність людського рецептора TrkA, і злиття відбувається з послідовністю константного домену імуноглобуліну. В інших варіантах реалізації послідовність константного домену імуноглобуліну являє собою послідовність константного домену важкого ланцюга імуноглобуліну. В інших варіантах реалізації асоціація двох злиттів рецептора TrkA-важкого ланцюга імуноглобуліну (наприклад, за допомогою ковалентного зв'язу-

вання дисульфідним зв'язком (зв'язками)) приводить до структури, подібної гомодимерному імуноглобуліну. Легкий ланцюг імуноглобуліну може бути, крім того, зв'язаний з однією або обома химерами імуноглобуліну рецептора TrkA в зв'язаному дисульфідом димері для отримання гомотривимірної або гомотетравимірної структури. Приклади відповідних імуоадгезинів TrkA включають ті, які описані в патенті США №6152189.

В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF включає, щонайменше, одне антитіло проти TrkA, здатне блокувати, пригнічувати, змінювати і/або зменшувати фізичну взаємодію NGF з рецептором TrkA і/або низхідну передачу сигналів, за допомогою чого біологічна активність NGF знижується і/або блокується. Антитіла проти TrkA відомі в даній галузі. Ілюстративні антитіла проти TrkA включають антитіла, описані в публікаціях PCT №№WO 97/21732, WO 00/73344, WO 02/15924, і в публікації США №20010046959.

В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF включає, щонайменше, одне антитіло проти p75, здатне блокувати, пригнічувати і/або зменшувати фізичну взаємодію NGF з рецептором p75 і/або низхідну передачу сигналів, за допомогою чого знижується і/або блокується біологічна активність NGF.

В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF включає, щонайменше, один інгібітор кінази, здатний інгібувати низхідну передачу сигналів кінази, пов'язану з активністю рецептора TrkA і/або p75. Ілюстративним інгібітором кінази є K252a або K252b, який відомий в даній галузі і описаний в публікаціях 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, див. реферат і 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) і патент США №6306849.

Очікується, що при пошуку клініцистами буде ідентифікований ряд інших категорій антагоністів NGF.

Ідентифікація антагоністів NGF

Антитіла проти NGF та інші антагоністи NGF можна ідентифікувати або характеризувати з використанням способів, відомих в даній галузі, за допомогою чого виявляється і/або вимірюється зменшення, полегшення або нейтралізації біологічної активності NGF. Наприклад, для ідентифікації антагоністів NGF можна використати аналіз активації рецепторів кінази (KIRA), описаний в патентах США №№5766863 і 5891650. Даний аналіз типу ELISA (імуоферментного аналізу) підходить для якісного або кількісного вимірювання активації кінази вимірюванням аутофосфорилування домену кінази рецептора протеїн-тирозин-кінази (що іменується далі "rPTK"), наприклад, рецептор TrkA, а також для ідентифікації і характеристики потенційних антагоністів відібраного rPTK, наприклад, TrkA. Перша стадія аналізу включає фосфорилування домену кінази рецептора кінази, наприклад, рецептора TrkA, де рецептор присутній в клітинній мембрані еукаріотичної клітини. Рецептор може

являти собою ендogenous рецептор або нуклеїнову кислоту, що кодує рецептор, або конструкція рецептора може бути трансформована в клітину. Зазвичай, першу тверду фазу (наприклад, ямка першої планшети аналізу) покривають по суті однорідною популяцією таких клітин (зазвичай лінії клітин ссавців) так, що клітини прилипають до твердої фази. Часто клітини є клейкими і тому природно прилипають до першої твердої фази. Якщо використовується «конструкція рецептора», то він зазвичай включає злиття рецептора кінази і поліпептид flag. Поліпептид flag розпізнається агентом захоплення, часто антитілом захоплення, в частині ELISA аналізу. Речовину, що аналізується, таку як перспективне антитіло проти NGF або інший антагоніст NGF, потім додають разом з NGF до ямки, що має клейкі клітини, так що рецептор тирозинкінази (наприклад, рецептор TrkA) відкритий для впливу (або контакту з) NGF і речовиною, що аналізується. Даний аналіз забезпечує можливість ідентифікації антитіл (або іншого антагоніста NGF), які інгібують активацію TrkA його лігандом NGF. Після контакту з NGF і речовиною, що аналізується, клейкі клітини солюбілізуються з використанням лізуючого буфера (який містить солюбілізуючий детергент) і обережного перемішування, за допомогою цього вивільнюючи клітинний лізат, який може бути безпосередньо підданий частині ELISA аналізу, без необхідності концентрації або освітлення клітинного лізату.

Отриманий таким чином клітинний лізат потім готовий для того, щоб зазнати стадії ELISA аналізу. Як перший етап стадії ELISA, друга тверда фаза (зазвичай ямка титрувального мікропланшети ELISA) вкрита агентом захоплення (часто антитілом захоплення), який специфічно зв'язується з рецептором тирозинкінази, або, у випадку конструкції рецептора, з поліпептидом flag. Покриття другої твердої фази проводять так, що агент захоплення прилипає до другої твердої фази. Агент захоплення являє собою в цілому моноклональне антитіло, але, як описано в представлених тут прикладах, можна також використати поліклональні антитіла. Отриманий клітинний лізат потім піддають впливу або контакту з прилипаючим агентом захоплення так, що рецептор або конструкція рецептора прилипає (або захоплюється) до другої твердої фази. Потім проводять етап промивання з тим, щоб видалити не зв'язаний клітинний лізат, залишаючи захоплений рецептор або конструкцію рецептора. Прилипаючий або захоплений рецептор або конструкцію рецептора потім піддають впливу або контакту з антитілом проти фосфотирозину, яке ідентифікує фосфорильовані залишки тирозину в рецепторі тирозинкінази. В одному варіанті реалізації антитіло проти фосфотирозину кон'юговано (прямо або опосередковано) з ферментом, який каталізує зміну кольору не радіоактивного кольорового реагенту. Відповідно, фосфорильовання рецептора можна виміряти подальшою зміною кольору реагенту. Фермент може бути зв'язаний з антитілом проти фосфотирозину безпосередньо, або кон'югуюча молекула (наприклад, біотин) може бути кон'югована з антитілом проти фосфотирозину, і фермент може бути в подаль-

шому пов'язаний з антитілом проти фосфотирозину через кон'югуючу молекулу. Нарешті, зв'язування антитіла проти фосфотирозину із захопленням рецептором або конструкцією рецептора вимірюють, наприклад, зміною кольору в кольорового реагенту.

Антагоніст NGF можна також ідентифікувати інкубацією перспективної речовини з NGF і моніторингом будь-якої однієї або декількох наступних характеристик: (а) зв'язування з NGF; (b) інгібування біологічної активності NGF або низхідних шляхів, опосередкованих функцією передачі сигналів NGF; (c) інгібування, блокування або зменшення активації рецептора NGF (включаючи димеризацію і/або аутофосфорильовання TrkA); (d) збільшення виведення NGF; (e) лікування або запобігання будь-якому аспекту післяопераційного болю; (f) інгібування (зменшення) синтезу, продукції або вивільнення NGF; (g) посилення відновлення після операції. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF можна ідентифікувати інкубацією перспективної речовини з NGF і моніторингом зв'язування і супровідного зменшення або нейтралізації біологічної активності NGF. Аналіз зв'язування можна виконати очищеним поліпептидом (поліпептидами) NGF або клітинами, природно експресуючими або трансфікованими для експресії поліпептиду (поліпептидів) NGF. В одному варіанті реалізації аналіз зв'язування являє собою аналіз конкурентного зв'язування, де оцінюють здатність перспективного антитіла конкурувати з відомим антагоністом NGF за зв'язування NGF. Аналіз можна виконувати в різних форматах, включаючи формат ELISA. В інших варіантах реалізації антагоніст NGF ідентифікують інкубацією перспективної речовини з NGF і моніторингом супровідного інгібування димеризації і/або аутофосфорильовання рецептора TrkA.

Після первинної ідентифікації активності перспективного антагоніста NGF можна додатково підтвердити і уточнити біологічними аналізами, відомими як тести видів націлюваної біологічної активності. Альтернативно, біологічні аналізи можна використати для прямого скринінгу перспективних речовин. Наприклад, NGF сприяє ряду змін, що морфологічно розпізнаються, в реагуючих клітинах. Вони включають, але не обмежуються, сприяння диференціації клітин PC 12 і посилення росту нейритів з цих клітин (Urfer et al., *Biochem.* 36: 4775-4781 (1997); Tsoulfas et al., *Neuron* 10: 975-990 (1993)), сприяння розростанню нейритів з експлантатів реагуючих сенсорних і симпатичних гангліїв (Levi-Montalcini, R. і Angeletti, P. *Nerve growth factor.* *Physiol. Rev.* 48, 534-569, 1968) і сприяння виживанню нейронів, залежних від NGF, таких як нейрони ембріонального ганглія дорсального корінця, ганглія трійчастого нерва або нейронів симпатичного ганглія (наприклад, Chun & Patterson, *Dev. Biol.* 75: 705-711, (1977); Buchman & Davies, *Development* 118: 989-1001, (1993)). Так, аналіз інгібування біологічної активності NGF включає культивування клітин, що реагують на NGF, з NGF плюс речовина, що аналізується, така як перспективне антитіло проти NGF або перспективний антагоніст NGF. Після відповідного періоду

часу буде аналізуватися реакція клітин (диференціювання клітин, розростання нейритів або виживання клітин).

Здатність перспективного антагоніста NGF блокувати або нейтралізовувати біологічну активність NGF можна оцінити моніторингом здатності перспективної речовини інгібувати опосередковане NGF виживання в біологічному аналізі виживання гангліїв дорсального корінця ембріонів щурів, як описано в публікації Hongo et al., *Hybridoma* 19: 215-227 (2000).

Композиції для використання в способах винаходу

Композиції, що використовуються в способах за винаходом, містять ефективну кількість антагоніста NGF (такого як антитіло проти NGF) і в деяких варіантах реалізації композиції, крім того, включають фармацевтично прийнятний ексципієнт. У деяких варіантах реалізації композиція призначена для використання в будь-якому зі способів, описаних в даному описі. Приклади таких композицій, а також як їх складати, також описані в розділі, представленою вище, і нижче. В одному варіанті реалізації композиція включає антагоніст NGF. В іншому варіанті реалізації композиція включає один або декілька антагоністів NGF. В іншому варіанті реалізації композиція включає один або декілька антагоністів NGF, вибраних з будь-якого одного або декількох з наступних: антагоніста (наприклад, антитіла), який зв'язує (фізично взаємодіє) з NGF, антагоніста, який зв'язується з рецептором NGF (таким як рецептор TrkA і/або p75), і антагоніста, який зменшує (гальмує і/або блокує) низхідну передачу сигналів NGF. У ще одних варіантах реалізації композиція включає будь-який антагоніст NGF, який не являє собою імуноадгезин TrkA (Тобто, не є імуноадгезином TrkA). В інших варіантах реалізації композиції включає будь-який антагоніст NGF, який не є антитілом проти NGF. У ще одних варіантах реалізації композиція включає будь-який антагоніст NGF, який не є імуноадгезином TrkA і не є антитілом проти NGF. В інших варіантах реалізації антагоніст NGF інгібує (зменшує) синтез, продукцію або вивільнення NGF. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF зв'язує NGF і не вступає в істотну перекресну взаємодію з нейротропінами, що вивільнюються (такими як NT3, NT4/5 і/або BDNF). У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF не пов'язаний з несприятливою імунною відповіддю. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF вибраний з групи, що складається з антитіла проти NGF, антисмислової молекули, направленої на NGF (включаючи антисмислову молекулу, направлену на нуклеїнову кислоту, що кодує NGF), антисмислову молекулу, направлену на рецептор NGF (такий як TrkA і/або p75), інгібіторну сполуку NGF, структурний аналог NGF, домінантно-негативну мутацію рецептора TrkA, який зв'язує NGF, імуноадгезин TrkA, антитіло проти TrkA, антитіло проти p75 та інгібітор кінази. В іншому варіанті реалізації антагоніст NGF являє собою антитіло проти NGF. В інших варіантах реалізації антитіло проти NGF розпізнає людський NGF. У деяких варіантах реалізації антитіло проти NGF є людським. У ще од-

них варіантах реалізації антитіло проти NGF є гуманізованим (таким як описане в даному описі антитіло E3). У ще одних варіантах реалізації антитіло проти NGF включає константну ділянку, яка не запускає непотрібну або небажану імунну відповідь, таку як опосередкований антитілом лізис або ADCC. В інших варіантах реалізації антитіло проти NGF включає один або декілька CDR антитіла E3 (наприклад, 1,2,3,4, 5 або, в деяких варіантах реалізації, усі 6 CDR з E3).

Зрозуміло, що композиції можуть включати більше, ніж один антагоніст NGF. Наприклад, композиція може включати декілька членів класу антагоністів NGF (наприклад, суміш антитіл проти NGF, які розпізнають різні епітопи NGF), а також члени різних класів антагоністів NGF (наприклад, антитіло проти NGF і сполуку, що інгібує NGF). Інші ілюстративні композиції включають декілька антитіл проти NGF, які розпізнають один і той самий епітоп (епітопи), різні види антитіл проти NGF, які зв'язуються з різними епітопами NGF, або різні сполуки, що інгібують NGF.

Композиція, що використовується в даному винаході, може, крім того, містити фармацевтично прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams & Wilkins, Ed. K.E. Hoover.) у формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів в дозуваннях і концентраціях, що використовуються, і можуть містити буфери, такі як фосфат, цитрат, та інші органічні кислоти; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту та метіонін; консервуючі речовини (такі як хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію, хлорид бензетонію; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил або пропілпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол і м-крезол); поліпептиди низької молекулярної маси (менше, ніж приблизно 10 залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізін; моносахариди, дисахариди, та інші вуглеводні, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатоутворюючі агенти, такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; протіюни, що утворюють сіль, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білка); і/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як TWEENTM, PLURONICSTM або поліетиленгліколь.. (PEG). Фармацевтично прийнятні ексципієнти далі описані в даному описі. Антагоніст NGF і його композиції можна також застосовувати в поєднанні з іншими засобами, які служать для посилення і/або доповнення ефективності засобів.

Набори

Винахід також включає набори для використання в даних способах. Набори винаходу включають один або декілька контейнерів, що містять антагоніст NGF (зокрема, антитіло, таке як описане в даному описі гуманізоване антитіло E3), а в деяких варіантах реалізації, крім того, містять ін-

струкції по застосуванню у відповідності до будь-якого з описаних в даному описі способів. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF може являти собою будь-який антагоніст NGF, описаний в даному описі. У ще одних варіантах реалізації набір включає антагоніст NGF, який не є імуноадгезином TrkA (тобто відрізняється від імуноадгезину TrkA). В інших варіантах реалізації набір включає антагоніст NGF, який не є антитілом проти NGF. У ще одних варіантах реалізації набір включає будь-який антагоніст NGF, який не є імуноадгезином TrkA і не є антитілом проти NGF. У деяких варіантах реалізації набір включає антитіло проти NGF (таке як описане в даному описі антитіло E3). В інших варіантах реалізації набір включає антитіло проти NGF, що містить один або декілька CDR антитіла E3 (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 або, в деяких варіантах реалізації, усі 6 CDR з E3). У ще одних варіантах реалізації інструкції містять опис введення антагоніста NGF для лікування, полегшення і/або запобігання післяопераційному болю відповідно до будь-якого з описаних в даному описі способів. Набір може, крім того, включати опис вибору індивідуума, придатного для лікування, на основі ідентифікації того, чи є в індивідуума післяопераційний біль, або чи є в індивідуума ризик післяопераційного болю. У ще одних варіантах реалізації інструкція містить опис введення антагоніста NGF для лікування, запобігання і/або полегшення післяопераційного болю. У ще одних варіантах реалізації інструкції включають опис введення антагоніста NGF індивідууму з ризиком післяопераційного болю.

Інструкції, що відносяться до застосування антагоніста NGF, загалом включають інформацію, що стосується дозування, схеми введення та шляхів введення для лікування, що передбачається. Контейнери можуть являти собою стандартні дози, упаковки основної кількості продукту (наприклад, упаковки численної кількості доз) або субстандартні дози. Інструкції, що постачаються в наборах винаходу, зазвичай являють собою письмові інструкції на етикетці або вкладиші упаковки (наприклад, лист паперу, включений до набору), але також прийнятні інструкції, що зчитуються пристроєм (наприклад, інструкції, що переносяться на магнітному або оптичному диску).

На етикетці або вкладиші упаковки вказано, що композиція застосовується для лікування, полегшення і/або запобігання післяопераційному болю. Інструкції можуть бути надані для здійснення будь-якого з описаних в даному винаході способів.

Набори даного винаходу знаходяться у придатній упаковці. Придатна упаковка включає, але не обмежується ними, флакончики, пляшки, банки, гнучкі упаковки (наприклад, запаяні мішечки Мілара або пластикові мішечки) та їм подібні. Передбачені також упаковки для використання в комбінації зі спеціальним пристроєм, таким як інгалятор, пристрій для інтраназального введення (наприклад, розпилювач), або пристрій для вливання, такий як міни насос. Набір може мати отвір стерильного доступу (наприклад, контейнер може являти собою мішечок або флакончик з розчином для

внутрішньовенного введення, що має пробку, що проколюється голкою для підшкірної ін'єкції). Контейнер може також мати отвір стерильного доступу (наприклад, контейнер може являти собою мішечок або флакончик з розчином для внутрішньовенного введення, що має пробку, що проколюється голкою для підшкірної ін'єкції). Що-найменше, одну активну речовину в композиції являє собою антагоніст NGF, такий як антитіло проти NGF. Контейнер може, крім того, включати другу фармацевтично активну речовину.

Набори можуть необов'язково надавати додаткові компоненти, такі як буфери та інтерпретуюча інформація. Зазвичай, набір включає контейнер і етикетку або вкладиш (вкладиші) упаковки на контейнері або зв'язані з контейнером.

Введення антагоніста NGF і оцінка лікування

Антагоніст NGF можна водити індивідууму будь-яким прийнятним шляхом. Наприклад, антагоніст NGF можна ввести разом перорально, внутрішньовенно, сублінгвально, підшкірно, внутрішньоартеріально, в синовіальну порожнину, внутрішньоміхурово (наприклад, через сечовий міхур), внутрішньом'язово, внутрішньосерцево, інтраторакально, внутрішньочеревинно, всередину шлуночків, сублінгвально, інгаляцією, супозиторієм або трансдермально. Їх можна ввести перорально, наприклад, у формі таблеток, саше, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, вафель, льодяників, жувальних гумок або їм подібних, отриманих процедурами, визнаними в даній галузі. Фахівцеві в даній галузі повинно бути очевидно, що описані в даному описі приклади не призначені бути такими, що обмежують, але можуть бути ілюстративними для методик, що є.

Відповідно, в деяких варіантах реалізації антагоніст NGF, такий як антитіло проти NGF, вводять індивідууму відповідно до відомих способів, таких як внутрішньовенне введення, наприклад, у вигляді болюсу або безперервним вливанням протягом періоду часу, внутрішньом'язовим, внутрішньочеревинним, введенням у спинномозкову рідину, підшкірним, внутрішньосуглобовим, в синовіальну порожнину, підболонокним, пероральним, інгаляційним або місцевим шляхами. Розпилювачі для рідких композицій, що є в продажу, включаючи струминні розпилювачі та ультразвукові розпилювачі, можна використати для введення. Рідкі розпилювачі можна безпосередньо розпилювати, а ліофілізований порошок можна розпилювати після розчинення. Альтернативно, антагоніст NGF можна розпилювати у вигляді аерозолу з використанням фторвуглецевої композиції та інгалятором відміряних доз, або інгаляційно вводити у вигляді ліофілізованого та меленого порошку.

В одному варіанті реалізації антагоніст NGF вводять за допомогою сайт-специфічних або націлених місцевих методик доставки. Приклади методик сайт-специфічної або націленої місцевої доставки включають різні депоновані джерела антагоніста NGF, що імплантуються, або катетери для місцевої доставки, такі як катетери для вливань, катетер, що вводиться, або голчастий катетер, синтетичні трансплантати, обгортки адвентиції, шунти та стенти або інші пристрої, що

імплантуються, сайт-специфічні носії, пряму ін'єкцію, або пряму аплікацію (див., наприклад, публікацію PCT №WO 00/53211 і патент США №5981568).

Різні композиції антагоніста NGF (такого як антитіло проти NGF) можна застосовувати для введення. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF можна вводити окремо. У деяких варіантах реалізації антагоніст NGF включає антитіло проти NGF, і може бути в різних композиціях, включаючи композиції, що містять фармацевтично прийнятний екеципієнт. Фармацевтично прийнятні ексципієнти відомі в даній галузі, і вони являють собою відносно інертні речовини, які полегшують введення фармакологічно ефективної речовини. Наприклад, екеципієнт може додати форму або консистенцію або діяти в якості розчинника. Придатні ексципієнти включають, але не обмежуються, стабілізуючі речовини, змочувальні та емульгуючі речовини, солі для зміни осмолярності, інкапсулюючі речовини, буфери та підсилювачі проникнення через шкіру. Ексципієнти, а також композиції для парентеральної та не парентеральної доставки препарату викладені в Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

У деяких варіантах реалізації вказані засоби включають до композицій для введення ін'єкцією (наприклад, внутрішньочеревинно, внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньом'язово тощо). Відповідно, вказані речовини можна комбінувати з фармацевтично прийнятними носіями, такими як сольовий розчин, розчин Рінгера, розчин декстрози та їм подібні. Конкретна схема дозування, тобто доза, час введення та повторення будуть залежати від конкретного індивідуума і медичного анамнезу індивідуума.

Антитіло проти NGF можна вводити з використанням будь-якого придатного способу, включаючи введення ін'єкцією (наприклад, внутрішньочеревинно, внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньом'язово тощо). Антитіло проти NGF можна також вводити шляхом інгаляції, як описано в даному описі. Загалом, для введення антитіл проти NGF початкове дозування перспективного засобу може становити приблизно 2мг/кг. Для даного винаходу типове добове дозування може знаходитися в будь-якому діапазоні приблизно від 3мг/кг до 30мг/кг, до 300мг/кг, до 3мг/кг, до 30мг/кг, до 100мг/кг або більше, в залежності від чинників, що згадуються вище. Для повторних введення протягом декількох днів або довше, в залежності від стану, лікування продовжують доти, поки не відбувається бажане пригнічення симптомів, або доти, поки не будуть досягнуті терапевтичні рівні, достатні для зменшення післяопераційного болю. Ілюстративна схема введення включає введення початкової дози приблизно 2мг/кг з подальшим введенням підтримуючої дози приблизно 1мг/кг антитіла проти NGF 1разів/тиж., або подальшим введенням підтримуючої дози приблизно 1мг/кг 1разів/2тиж. Однак можна використати інші схеми введення, в залежності від типу фармакокінетичного розкладення, якого бажає досягнути лікар. Наприклад, передбачено введення від одного до

чотирьох разів/тиж. Хід даного лікування легко контролюється звичайними методиками та аналізами. Схема дозування (включаючи антагоніст (антагоністи) NGF), може варіюватися з плином часу.

Загалом, коли це не антитіло, антагоніст NGF (в деяких варіантах реалізації) можна вводити в дозуванні від 0,1 до 300мг/кг маси тіла пацієнта, розділеної на дози від однієї до трьох, або як розкрито в даному описі. У деяких дорослих пацієнтів з нормальною масою тіла можна вводити дози в діапазоні приблизно від 0,3 до 5,00мг/кг. Конкретна схема дозування, тобто, доза, час введення і повторення, будуть залежати від конкретного індивідуума і медичного анамнезу вказаного індивідуума, а також властивостей окремих засобів (таких як період напіввиведення засобу та інших міркувань, добре відомих в даній галузі).

Для даного винаходу відповідне дозування антагоніста NGF буде залежати від антагоніста (антагоністів) NGF, що використовується, (або їх композицій), типу і тяжкості болю, що підлягає лікуванню, від того, чи вводять засіб з метою запобігання або лікування, попереднього лікування клінічного анамнезу пацієнта і реакції на засіб, і на розсуд лікаря-куратора. Зазвичай клініцист вводить антагоніст NGF, такий як антитіло проти NGF доти, поки не буде досягнуте дозування, яке дасть бажаний результат.

Емпіричні міркування, такі як період напіввиведення, загалом будуть брати участь у визначенні дозування. Наприклад, антитіла, які сумісні з імунною системою людини, такі як гуманізовані антитіла, або повністю людські антитіла, можна використати для продовження періоду напіввиведення антитіла і для запобігання атаці на антитіло імунної системи хазяїна. Частоту введення можна визначити і підібрати протягом курсу терапії, і вона загалом, але необов'язково, основана на лікуванні і/або пригніченні і/або полегшенні і/або затримці болю. Альтернативно, можуть бути доцільні композиції тривалого, безперервного вивільнення антитіла проти NGF. Різні композиції і пристрої для досягнення пролонгованого вивільнення відомі в даній галузі.

В одному варіанті реалізації дозування для антагоніста NGF можна визначити емпірично в індивідуумів, яким антагоніст NGF (такий як антитіло) вводили один або декілька разів. Індивідуумам вводять зростаючі дозування антагоніста NGF, наприклад, антитіла проти NGF. Для оцінки ефективності антагоніста NGF можна стежити за індикатором болю.

Введення антагоніста NGF у відповідності до способів даного винаходу може бути безперервним або переривчастим, в залежності, наприклад, від фізіологічного стану реципієнта, від того, чи є мета введення терапевтичною або профілактичною, і від інших чинників, відомих досвідченим практикуючим лікарям. Введення антагоніста NGF (наприклад, якщо антагоніст NGF являє собою антитіло проти NGF) може бути по суті безперервним протягом заздалегідь вибраного періоду часу або може бути у вигляді ряду доз, що вводяться через проміжки часу, наприклад, до, під час або

після розвитку болю; перед, під час, перед і після, під час і після, перед і під час або перед, під час і після розвитку болю. Введення може бути здійснено перед, під час і/або після поранення, розрізу, травми, операції і будь-якого іншого явища, яке, ймовірно, спричинить виникнення післяопераційного болю.

У деяких варіантах реалізації може бути присутнім більше одного антагоніста NGF, такого як антитіло. Антагоністи можуть бути одними і тими самими, або відмінними один від одного. Можуть бути присутніми, щонайменше, один, щонайменше, 2, щонайменше, 3, щонайменше, 4, щонайменше, 5 різних антагоністів NGF. Загалом, вказані антагоністи NGF мають комплементарні види активності, які не впливають несприятливо один на одну. Антагоністи NGF можна застосовувати в поєднанні з іншими засобами, які слугують для посилення і/або доповнення ефективності засобів.

Терапевтичні композиції антагоніста NGF (такого як антитіло), що використовуються у відповідності до даного винаходу, отримують для зберігання змішуванням антитіла, що має міру чистоти, що вимагається, з не обов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)), у формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів у дозуваннях і концентраціях, що використовуються, і можуть включати буфери, такі як фосфат, цитрат і інші органічні кислоти; солі, такі як хлорид натрію; антиоксиданти, що включають аскорбінову кислоту і метіонін; консервуючі речовини (такі як хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію, хлорид бензетонію; фенол, бутіл або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол і м-крезол); поліпептиди низької молекулярної маси (менше, ніж приблизно 10 залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди, та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатоутворюючі речовини, такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; протиіони, що утворюють сіль, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білка); і/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як TWEENTM, PLURONICSTM або поліетиленгліколь (PEG).

Ліпосоми, що містять антагоніст NGF (такий як антитіло) отримують способами, відомими в даній галузі, такими, як описано в Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980) і патенти США №4485045 і 4544545. Ліпосоми, які посилювали час циркуляції, розкриті в патенті США №5013556. Зокрема, корисні ліпосоми можна генерувати способом випарювання в оберненій фазі з ліпідною композицією, включаючої фосфатидилхолін, холестерин і дериватизований PEG фосфа-

тідилетаноламін (PEG-PE). Ліпосоми піддають екструзії через фільтри певного розміру пор для отримання ліпосом з необхідним діаметром.

Активні інгредієнти можуть також бути захоплені в мікрокапсули, отримані, наприклад, методами коацервації або міжповерхневої полімеризації, наприклад, відповідно гідроксиметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули і полі(метилметакрилатні) мікрокапсули, в колоїдні системи доставки препарату (наприклад, ліпосоми, мікросфери альбуміну, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методи розкриті в Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

Можна отримати препарати пролонгованого вивільнення. Відповідні приклади препаратів пролонгованого вивільнення включають напівпроникні матриці твердого гідрофобного полімеру, що містять антитіло, причому матриці представлені у вигляді спрофільованих виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул. Приклади матриць пролонгованого вивільнення включають поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі (2-гідроксиетилметакрилат) або полівініловий спирт), полілактиди (патент США №3773919), співполімери L-глутамової кислоти та 7-етил-L-глутамату, етиленвінілацетату, що не розкладається, співполімери молочної кислоти-гліколевої кислоти, що розкладаються, такі як LUPRON DEPOTTM (ін'єктовані мікросфери, складені з співполімера молочної кислоти-гліколевої кислоти та ацетату лейпроліду), ізобутиратацетату сахарози та полі-D-(-)-3-гідроксимасляної кислоти.

Композиції, що підлягають використанню для введення *in vivo*, повинні бути стерильними. Це легко здійснюється, наприклад, фільтрацією через стерильні фільтраційні мембрани. Наприклад, терапевтичні композиції антитіла проти NGF в цілому вміщують в контейнер, що має стерильний отвір доступу, наприклад, мішечок з розчином для внутрішньовенного введення або флакончик, що має пробку, яку можна проколоти голкою для підшкірних ін'єкцій.

Композиції у відповідності до даного винаходу можуть бути в стандартних лікарських формах, таких як таблетки, пілюлі, капсули, порошки, гранули, розчини або суспензії, або супозиторії, для перорального, парентерального або ректального введення, або введення інгаляцією або інсуфляцією.

Для отримання твердих композицій, таких як таблетки, основний активний інгредієнт змішують з фармацевтичним носієм, наприклад, звичайними інгредієнтами таблетування, такими як кукурудзяний крохмаль, лактоза, сахароза, сорбіт, тальк, стеаринова кислота, стеарат магнію, дикальцій-фосфат або смоли та іншими фармацевтичними розчинниками, наприклад, водою, для формування твердої композиції попереднього складу, що містить однорідну суміш сполуки даного винаходу або його нетоксичної фармацевтично прийнятної солі. При іменуванні вказаних фармацевтичних композицій однорідними, мається на увазі, що активний інгредієнт рівномірно диспергований по композиції, так що композицію можна легко поді-

лити на еквівалентно ефективні стандартні лікарські форми, такі як таблетки, пілюлі та капсули. Потім дану тверду композицію попереднього складу поділяють на стандартні лікарські форми типу, описаного вище, що містять від приблизно 0,1 до приблизно 500мг активного інгредієнта даного винаходу. Таблетки або пілюлі нової композиції можна покрити або виготовити шляхом змішування іншим чином для отримання лікарської форми, що забезпечує перевагу тривалої дії. Наприклад, таблетка або пілюля може включати внутрішню і зовнішню частини лікарської форми, причому остання представлена у вигляді оболонки навколо першої. Вказані дві складові можна розділити ентросолубільним шаром, який служить для опору розкладанню в шлунку і забезпечує можливість внутрішньої частини пройти інтактною до 12-палу кишки або затримати вивільнення. Різноманітні матеріали можна використовувати для таких ентросолубільних шарів або покриттів, причому такі матеріали включають ряд полімерних кислот і сумішей полімерних кислот з такими матеріалами, як шеклак, цетиловий спирт і ацетат целюлози.

Придатні поверхнево-активні речовини включають, зокрема, неіонні речовини, такі як поліоксиди етиленсорбітани (наприклад, Tween™ 20, 40, 60, 80 або 85) та інші сорбітани (наприклад, Span™ 20, 40, 60, 80 або 85). Композиції з поверхнево-активною речовиною можуть містити від 0,05% до 5% поверхнево-активної речовини, або від 0,1 до 2,5%. Слід розуміти, що за необхідності можна додавати інші інгредієнти, наприклад, маніт або фармацевтично прийнятні носії.

Придатні емульсії можна отримати з використанням жирових емульсій, що є в продажу, таких як Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ і Lipiphysan™. Активний інгредієнт може бути або розчинений в заздалегідь змішаній емульсійній композиції, або альтернативно він може бути розчинений у олії (наприклад, олії соєвих бобів, олії сафлору, олії бавовняного насіння, кунжутній олії, кукурудзяній олії або мигдалевій олії), і емульсія утворюється після змішування з фосфоліпідом (наприклад, яєчними фосфоліпідами, фосфоліпідами соєвих бобів або лецитином соєвих бобів) і водою. Слід розуміти, що можна додати інші інгредієнти, наприклад, гліцерин або глюкозу, для регулювання тоничності емульсії. Придатні емульсії будуть зазвичай містити до 20% олії, наприклад, від 5 до 20%. Жирова емульсія може включати крапельки жиру від 0,1 до 1,0мкм, зокрема, від 0,1 до 0,5мкм і мати рН в діапазоні від 5,5 до 8,0.

Емульсійні композиції можуть являти собою композиції, отримані змішуванням антагоніста фактора росту нервів з Intralipid™ або його компонентами (масло соєвих бобів, яєчні фосфоліпіди, гліцерин і вода).

Композиції для інгаляції або інсуфляції включають розчини і суспензії в фармацевтично прийнятних, водних або органічних розчинниках або їх сумішах і порошки. Рідкі або тверді композиції можуть містити відповідні фармацевтично прийнятні ексципієнти, як викладено вище. У деяких варіантах реалізації композиції вводять пероральним або інтраназальним дихальним шляхом для міс-

цевого або системного ефекту. Композиції в переважно стерильних фармацевтично прийнятних розчинниках можна розпилювати з використанням газів. Розпилені розчини можна вдихати безпосередньо з розпилювального пристрою, або розпилювальний пристрій може бути прикріплений до лицевої маски, тенту або дихального апарату під переривчастим позитивним тиском. Композиції у вигляді розчину, суспензії або порошку можна вводити переважно перорально або інтраназально з пристроїв, які доставляють композицію відповідним чином.

Ефективність лікування можна оцінити способами, добре відомими в даній галузі.

Приклади

Наступні приклади надані для ілюстрації, але не обмеження винаходу.

Приклад 1

Лікування моноклональним антитілом проти NGF ефективне при лікуванні післяопераційного болю

Заявники використали модель болю, яка імітує післяопераційний біль, для оцінки ефективності лікування антитілом 911 проти NGF (мишачим моноклональним антитілом; див. Hongo et al., Hybridoma 19: 215-227 (2000)). Кожен експеримент включав 16 тварин (n=8 на групу). Антитіло проти NGF ін'єктували внутрішньочеревинно (в/ч) у різних концентраціях на експеримент (35 або 7мг/кг) за 15год. до розрізу. Контрольна група не отримувала антитіло, але їй ін'єктували в/ч сольовий розчин.

Тварини. Самців щурів лінії Sprague Dawley з масою тіла від 220 до 240г закупляли у компанії Harlan (San Diego) і акліматизували в умовах віварію протягом 1 тижня перед операцією.

Операція. Операція була основана на процедурі, описаній Brennan, et al., Pain 64: 493-501 (1996). Тварин наркотизували сумішшю 2% ізофлюрану і повітря, введення якої продовжували під час операції через носову ліжку. Підшовну поверхню правої задньої лапи готували тампоном з повідомо-йодом, і робили центральний поздовжній розріз довжиною 1см через шкіру і фасцію, починаючи в 0,5см від краю п'ятки і продовжуючи у напрямі пальців стопи. Вимірювання проводили лінійкою біля стопи, що утримувалася у фіксованому положенні. Підшовний м'яз підіймали з використанням викривленого пінцета і робили поздовжній розріз. М'яз розрізали на його повну глибину між відходженням і прикріпленням. Кровотечу зупиняли під час операції тиском, що спричинявся марлевым тампоном. Рану закривали двома матрацними швами (чорне моноволокно етикон розміру 5-0). Вказані шовні нитки зав'язували вузлами 5-6 разів, причому, перший вузол зав'язували нещільно. Рану обробляли тампоном з розчином бацитрацину. Тваринам давали можливість відновитися і відпочивати у чистих клітках, щонайменше, протягом 2год. перед тим як починали поведінкове тестування.

Оцінка болю в спокої. Кумулятивну балньу оцінку болю використовували для оцінки болю, пов'язаного зі спиранням на лапу. Тварин вміщували на пластикову сітку (решітка: 8мм²) у прозо-

рих пластикових клітках, які були підняті на платформу (висота 18 дюймів), що забезпечує можливість огляду нижньої сторони їх лап. Після 20хв. періоду акліматизації, функцію спирання на лапу оцінювали за шкалою від 0 до 2. Бальну оцінку 0 давали, якщо лапа ставала блідою або вдавлювалася до сітки, вказуючи на повну функцію спирання. Бальну оцінку 1 давали, якщо щур щадив лапу, ледве торкаючись шкірою сітки, за відсутності збліднення або вдавнення шкіри. Бальну оцінку 2 давали, якщо лапа утримувалася, повністю не торкаючись сітки. Відсмоктувати лапи вважали бальною оцінкою 2, якщо щур ще знаходився у спокої. Кожну тварину спостерігали протягом 1хв. через кожні 5хв. протягом 30хв. Суму 6 бальних оцінок (0-12), отриману протягом півгодинного періоду, використовували для оцінки болю в стопі з розрізом. Частоту бальних оцінок 2 також розраховували і використовували для оцінки частоти сильного болю або повного керування лапою твариною. Кожну тварину тестували за 24год. до операції (початковий рівень) і через 2год., 24год., 48год. і 12год. після операції. Результати цього експерименту показані на Фіг.1, яка зображає кумулятивну бальну оцінку болю у спокої, що спостерігався у тварин, які отримували лікування антитілом 911 проти NGF у дозі 35мг/кг. Дані результати демонструють, що лікування антитілом проти NGF значно зменшувало післяопераційний біль у спокої. Опорна функція була надійним показником того, наскільки тварина могла використати кінцівку, і тому вона була ефективним показником полегшення болю.

Оцінка механічно викликаного болю з використанням тактильної алодинії. Тактильну алодинію вимірювали волосками Semmes-Weinstein von Frey (Stoelting, Wood Dale, IL). Тварин вмішували в 12-мм клітки з днищем у вигляді пластикової сітки, підняті на платформу (висота: 18 дюймів), що забезпечують доступ до нижньої поверхні їх лап. Тварини звикали до цього оточення (протягом 1-2 днів за 1тиж.) перед початком експерименту. Після 15-хв. періоду акліматизації тактильну алодинію тестували дотиком до шкіри, медіальніше та проксимальніше точки початку розрізу на п'ятці задньої лапи тварини волосками Von Frey у висхідному порядку сили доти, поки не викликала реакція відсмоктувати лапи. Використовували волоски von Frey номерів від 4,08 до 5,46; кожний номер корелював із силою в грамах, як описано нижче. Кожний волосок Von Frey прикладали до поверхні під прямим кутом, згинаючи волосок на 2с або доти, поки не виникала реакція. Як тільки реакцію відсмоктування встановлювали, лапу повторно тестували в ще двох випробуваннях, починаючи наступним низхідним волоском Von Frey доти, поки реакція не виникала.

Найменшу кількість сили, необхідну для того, щоб викликати реакцію за трьома випробуваннями, реєстрували як поріг відсмоктування у грамах. Найбільша сила 29г підіймала лапу, а також викликала реакцію, представляючи таким чином точку відсічки. Якщо реакція не викликала, реєстрували середнє висхідне волокно «5,88». Таким чином, тестували і ліву і праву лапу. Кожну твари-

ну тестували за 24год. до операції (вихідний рівень) і через 2год., 24год., 48год. і 72год. після операції. Тактильну алодинію тестували після визначення бальної оцінки болю у спокої. Результати цього експерименту показані на Фіг.3, яка надає кумулятивну бальну оцінку у відповідь на механічну стимуляцію у тварин, що отримували лікування антитілом 911 проти NGF у дозі 7мг/кг. Дані результати продемонстрували, що лікування антитілом проти NGF зменшувало післяопераційний механічно викликаний біль.

Оцінка термічної гіпералгезії. Термічну гіпералгезію оцінювали підшовним тестом у щурів (Ugo Basile, Italy) відповідно до модифікованого способу Hargreaves, et al. (1988). Щурів привчали до пристрою, який складався з 4 окремих плексигласових ящиків на піднятому скляному столі. Рухоме джерело теплового випромінювання розташовувалося під столом і було сфокусоване на задню лапу. Поки тварина знаходилася у спокої, але не спала, натискали кнопку на контрольному ящику, джерело теплового випромінювання включалося, і автоматично реєструвався час, що пройшов доти, поки тварина не відсмоктувала лапу від теплового джерела. Дана латентність відсмоктувати лапи (PWL) виявляється залитою в джерело теплового випромінювання світловим детектором, який вловлює рухи лапи щура за зміною коефіцієнта відбиття випромінюючого джерела. Реєстрували величини латентності відсмоктувати лапи в секундах. Для запобігання пошкодженню тканини була точка автоматичної відсічки, що складала 22,5с PWL визначали 3-4 рази для обох задніх лап кожної тварини, середня величина якої представляла початкові рівні для правої і лівої задніх лап. Результати представлені у вигляді співвідношення бальної оцінки, виміряної на правій лапі (ділянка операції) і лівій лапі. Пристрій однократно калібрували (на початку дослідження) і встановлювали на інтенсивність 40 для отримання нормальної PWL, рівної приблизно 6с Кожну тварину випробовували за 24год. до операції (початковий рівень) і через 3год., 24год., 48год. і 72год. після операції. Вимірювання термічної гіпералгезії проводили після вимірювань тактильної алодинії. Результати цього експерименту показані на Фіг.2, яка зображає кумулятивну бальну оцінку, що спостерігається у тварин, що отримували лікування антитілом 911 проти NGF у дозі 35мг/кг у відповідь на термічне подразнення. Дані результати продемонстрували, що лікування антитілом проти NGF знижувало післяопераційну термічну гіпералгезію.

Приклад 2

Лікування післяопераційного болю з використанням гуманізованого антитіла проти NGF і порівняння з лікуванням післяопераційного болю опіоїдом

Ефект гуманізованого антитіла проти NGF, позначеного E3, на післяопераційний біль тестували на експериментальній моделі післяопераційного болю, як описано в прикладі 1. Антитіло E3 включає константну ділянку важкого ланцюга людського IgG2a, що містить наступні мутації: від A330P331 до S330S331 (нумерація амінокислот з послідовності IgG2a дикого типу

(див. Eur J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624); константну ділянку людського легкого ланцюга капа і варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюга, показані в таблицях 1 і 2.

Антитіло проти NGF ін'єктували внутрішньочеревинно (в/ч) з різних концентраціях антитіла (0,004, 0,01, 0,02, 0,1, 0,6 і 1мг/кг маси тіла тварини) за 15год. до розрізу. Негативна контрольна група не отримувала антитіло, але їй в/ч ін'єктували сольовий розчин. Фентанил у дозі 0,01мг/кг ін'єктували в/ч як позитивний контроль за 30хв. перед тестуванням через 24год. після операції. Кожний експеримент включав 8 тварин (n=8 на групу) для кожного стану, і контрольна група містила 56 тварин. Операцію виконували і кумулятивну бальну оцінку болю вимірювали, як описано в прикладі 1, за винятком того, що самців щурів лінії Sprague Dawley купували у компанії Harlan (Wisconsin). Біль у спокої оцінювали через 24год. після операції, як описано в прикладі 1.

Як показано на Фіг.4, гуманізоване антитіло проти NGF E3 значно зменшувало біль у спокої ($p<0,05$) після операції при введенні у дозуванні від 0,02мг/кг до 1мг/кг. А "*" означає статистично значущу відмінність від контролю ($p<0,05$). Лікування дозуванням 0,02мг/кг полегшувало пов'язану з болем поведінку, щонайменше, так само ефективно, як лікування фентанилом у дозі 0,01мг/кг. Ця доза фентанилу в 10 разів більша звичайної дози даного потужного опіоїду для людини.

Приклад 3

Передопераційне та післяопераційне лікування післяопераційного болю антитілом проти NGF

Ефективність антитіла проти NGF у зменшенні післяопераційного болю при введенні після розрізу випробовували на експериментальній моделі післяопераційного болю, описаній в прикладі 1, з використанням щурів лінії Sprague Dawley, придбаних у компанії Harlan (Wisconsin). Гуманізоване антитіло проти NGF E3 (0,5мг/кг) ін'єктували внутрішньовенно (в/в) через 2год. після нанесення розрізу. Контрольна група не отримувала антитіло, але їй ін'єктували в/в сольовий розчин. Операцію виконували і кумулятивну бальну оцінку болю оцінювали через 24год. після операції, як описано в прикладі 1. Як показано на Фіг.5, лікування антитілом проти NGF E3 значно ($p<0,05$) зменшувало біль у спокої через 24год. після розрізу, коли антитіло вводили через 2год. після нанесення розрізу. Дані результати продемонстрували, що антитіло проти NGF ефективно полегшувало післяопераційний біль при введенні після операції.

Ефективність антитіла проти NGF в зменшенні післяопераційного болю при введенні за 14 днів або 21 днів до розрізу випробовували на експериментальній моделі, описаній в прикладі 1, з використанням самців щурів лінії Sprague Dawley, придбаних у компанії Harlan (Wisconsin). Мишає моноклональне антитіло 911 проти NGF ін'єктували в/ч у різних концентраціях (1мг/кг або 5мг/кг) за 14 днів або 21 день до нанесення розрізу. Контрольній групі ін'єктували в/ч сольовий розчин. Операцію виконували і біль у спокої, виражений у вигляді кумулятивної бальної оцінки, оцінювали через 24год. після операції, як описано в прикладі

1. Як показано на Фіг.6 і 7, антитіло 911 проти NGF значно зменшувало біль у спокої в дозуванні 5мг/кг при введенні за 14 днів до операції, і зменшувало біль у спокої при ін'єкції за 21 день до операції.

Приклад 4

Лікування антитілом проти NGF не виявляє ефекту на загоєння ран

У науковій літературі є припущення, що лікування надмірною кількістю NGF може сприяти загоєнню ран у тварин, що страждають на цукровий діабет (Matsuda et al., (1998) J. Exp. Med 187 (3): 297-30) і виразок рогівки та шкіри (Lambiasi et al., (2003) Arch Ital Biol. 141 (2-3): 141-8). Для визначення того, чи порушить застосування антитіла проти NGF загоєння ран, ефект лікування антитілом проти NGF на загоєння ран випробовували у щурів.

Самців щурів лінії Sprague Dawley з масою тіла 250-350г придбали у компанії Harlan (Wisconsin), доставляли у віварій і давали акліматизуватися, щонайменше, протягом 1тиж. Тварин анестезували ізофлюраном, і дорзальну поверхню (спину) голили і очищували йодоповідомом з подальшою обробкою тампоном зі спиртом. Проводили розріз довжиною 2,5см через шкіру по середній лінії між лопатками. Кровотечу зупиняли тиском марлевым тампоном. Рану закривали чотирма одиночними швами етиконовими нитками розміру 4-0, і тваринам давали можливість відновитися. Потім тварин ділили на 3 групи: одна група отримувала однократні дози мишає моноклонального антитіла 911 проти NGF під час операції (1мг/кг в/ч); одна група отримувала кеторолак (5мг/кг/день протягом 5 днів, починаючи в день операції, внутрішньом'язово (IM)) як позитивний контроль; і контрольна група, що отримувала сольовий розчин (негативний контроль). Відомо, що кеторолак інгібує загоєння ран (Haws et al., (1996) Ann. Plast Surg. 37(2): 147-51; Gerstenfeld et al., (2003) J. Orthop Res. 21(4): 670-5).

Ділянку розрізу досліджували і фотографували щодня, починаючи в день після операції. Шви видаляли на 2-ий день після операції. Розрізи оцінювали в балах як «інтактні», якщо весь розріз залишався закритим, і «незагоєні», якщо весь або деяка частина розрізу повторно розходилися. Результати виражали у вигляді частки інтактних ран (тобто, кількість інтактних ран, поділена на загальну кількість тварин, у яких проводили бальну оцінку).

Як показано на Фіг.8, загоєння ран тварин, що отримували лікування антитілом 911 проти NGF дуже не відрізнялося від загоєння ран у тварин, що отримували лікування сольовим розчином. Таким чином, лікування проти NGF не виявило видимого ефекту на загоєння ран. Навпаки, загоєння ран було значно інгібоване у тварин, що отримували лікування кеторолаком, при порівнянні з тваринами, що отримували лікування сольовим розчином або антитілом 911 проти NGF ($p<0,0005$).

Гістологічну картину ран, що загоїлися, також досліджували у трьох щурів, що отримували лікування антитілом проти NGF, і трьох щурів, що отримували лікування сольовим розчином. Через

21 день після розрізу тварин умертвляли, і зразки шкіри, що включають ділянку розрізу, фіксували в формаліні, заливали в парафін і робили зрізи через ділянку розрізу. Ці зрізи обробляли антитілом проти NGF або сольовим розчином, забарвлювали гематоксиліном і еозином, і їх досліджував ветеринарний патологоанатом, що не мав даних про лікування, отримане тваринами. В жодній групі щурів не спостерігали відхилень від норми в загоєнні ран.

Приклад 5

Лікування післяопераційного болю низькомолекулярним антагоністом NGF K252a

Ефективність антагоніста NGF K252a при лікуванні післяопераційного болю тестували на моделі розрізу, описаній в прикладі 1. Розчин K252a в концентрації 25мг/мл готували в DMSO. До 250мкл розчину додавали 3500мкл розчину 45% циклодекстрину та ретельно змішували. Потім додавали 3750 мкл сольового розчину для отримання кінцевої концентрації 0,8333мг/мл K252a. У тварин (отриманих, як описано в прикладі 2) робили розріз, і біль у спокої оцінювали, як описано в прикладі 1. «Вихідний» кумулятивний біль у спокої визначали через 24год. після розрізу. Потім K252a ін'єктували в/ч у дозі 4мг/кг тваринам, що тестували, а контрольним тваринам ін'єктували розчин носія (розчин, що містить усі компоненти розчину K252a, за винятком K252a). Кумулятивні бальні оцінки болю у спокої визначалися через 1год. після лікування K252a або носія (відмічено «1H-P-tmt» на Фіг.) і через 3год. після лікування K252a або носія (відмічено «3H-P-tmt» на Фіг.) експериментатором, що не мав даних про лікування. Як показано на Фіг.9, лікування K252a значно зменшувало біль у спокої ($p < 0,005$) через 3год. після введення, тоді як лікування носієм не надавало такого ефек-

ту. Дані результати продемонстрували, що лікування K252a зменшувало біль у спокої в тій самій мірі, що і лікування антитілом проти NGF в аналогічних експериментах.

Приклад 6

Порівняння післяопераційного болю у тварин, що отримували лікування антитілом проти NGF або підібраним за ізотипом контрольним антитілом

Для того, щоб продемонструвати, що знеболюючий ефект антитіла проти NGF вимагає інгібування NGF, ефективність мишачого антитіла 911 проти NGF при лікуванні післяопераційного болю порівнювали з ефективністю такої самої дози підібраної за ізотипом мишачого антитіла, яке є імунореактивним з білком дрозофіли, що викликає амнезію. Експеримент проводили, як у прикладі 1, за винятком того, що щурів лінії Sprague Dawley придбали у компанії Harlan (Wisconsin). Щурів лікували в/ч введенням за 15год. перед операцією 1мг/кг або антитіла 911 проти NGF (відмічено «911» на Фіг.) або підібраного за ізотипом мишачого антитіла проти білка, що викликає амнезію (відмічено «amn ab» на Фіг.10). Через 24год. після операції біль у спокої (кумулятивну бальну оцінку) оцінював спостерігач, що не мав даних про лікування тварин. Як показано на Фіг.10, лікування антитілом 911 проти NGF значно ($p < 0,005$) зменшувало біль у спокої, в порівнянні з тваринами, що отримували лікування антитілом проти білка, що викликає амнезію. Дані результати продемонстрували, що знеболюючий ефект лікування антитілами проти NGF є специфічним.

Хоча представлений вище винахід був описаний з певними подробицями шляхом ілюстрації і описом прикладів для забезпечення ясності та розуміння, однак описи і приклади не треба розглядати як такі, що обмежують обсяг винаходу.

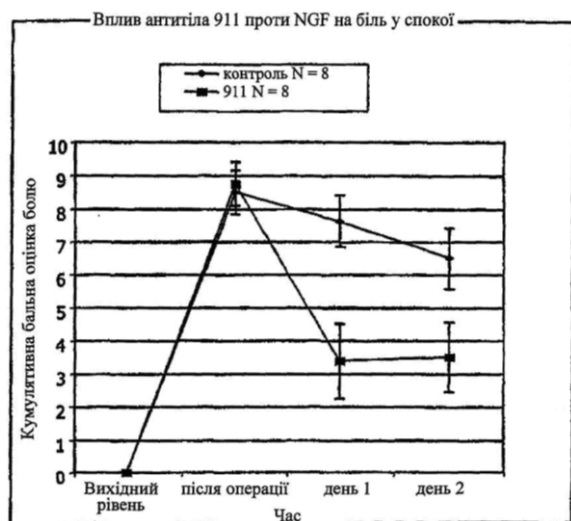


Fig. 1

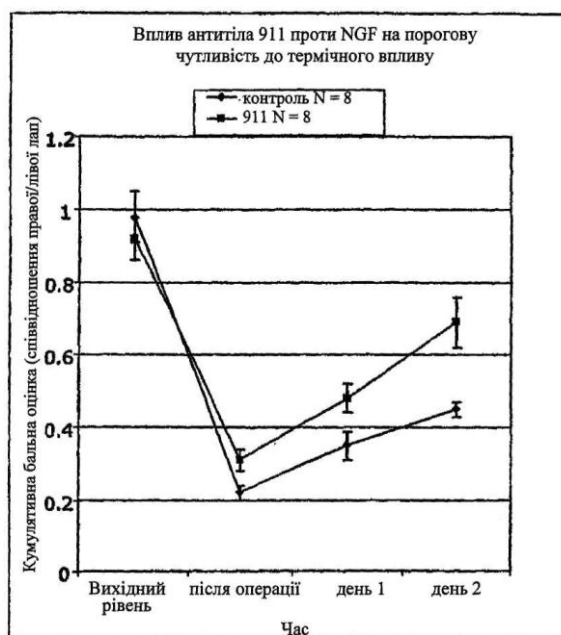
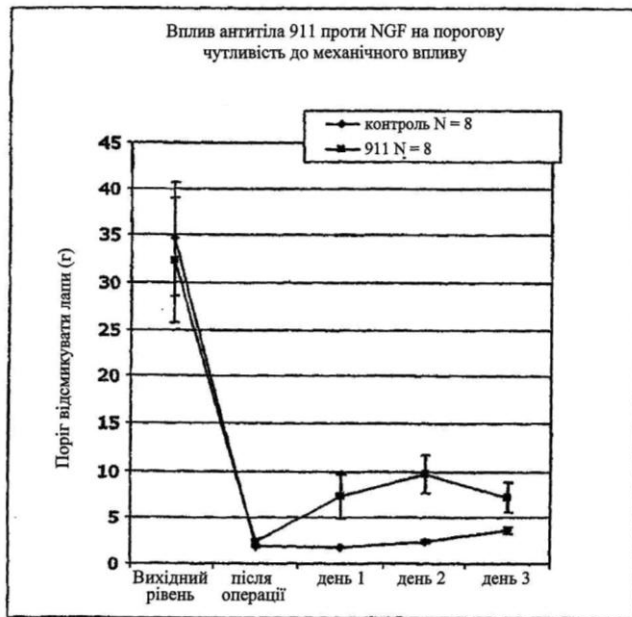
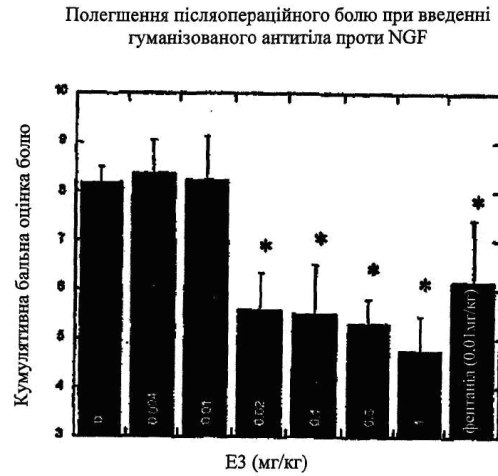


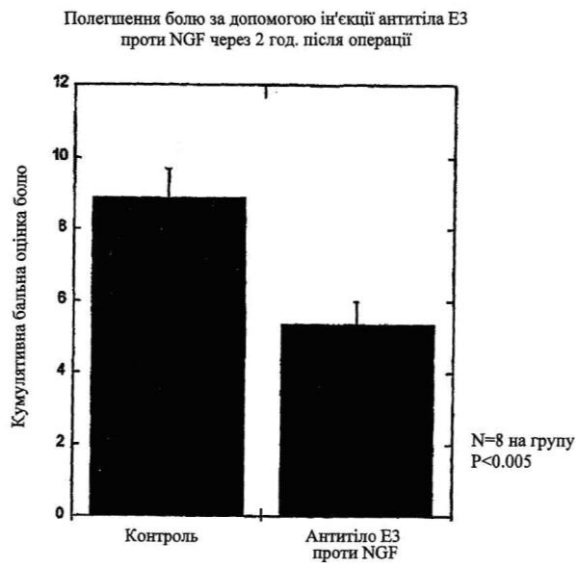
Fig. 2



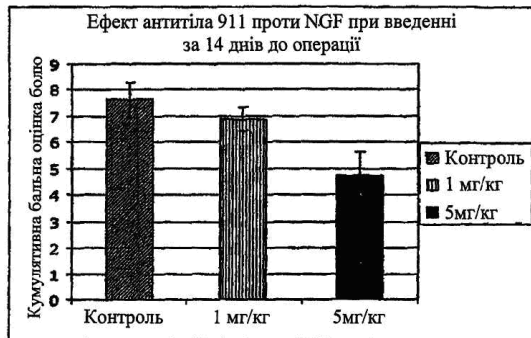
Фіг. 3



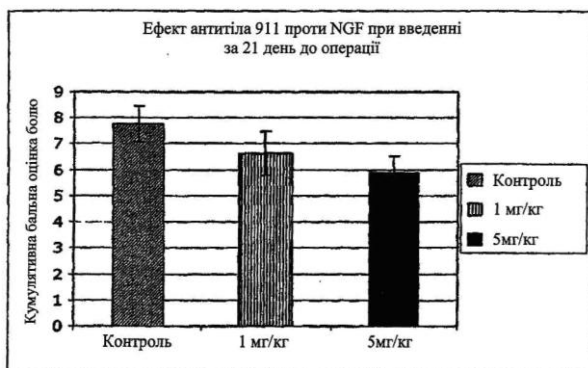
Фіг. 4



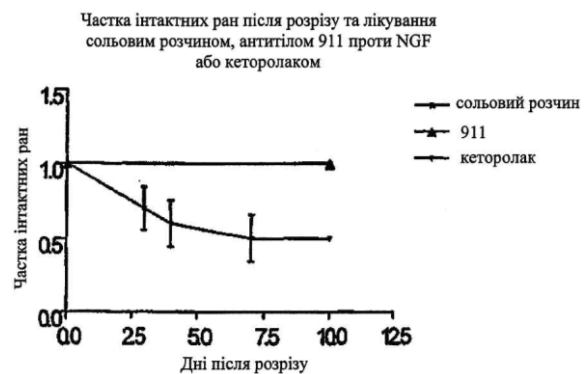
Фіг. 5



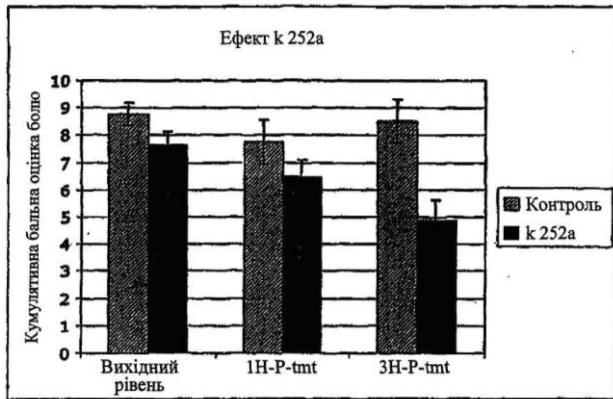
Фіг. 6



Фіг. 7

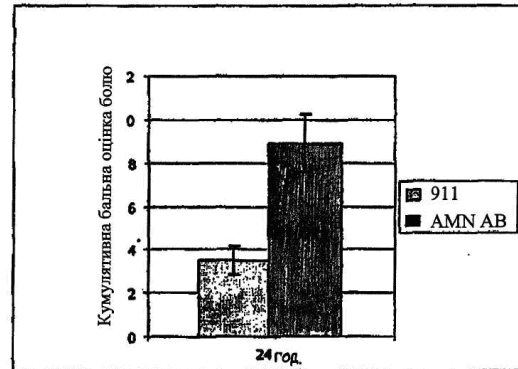


Фіг. 8



Фіг. 9

Специфічність знеболюючого ефекту при лікуванні
антитілом проти NGF



Фіг. 10