



УКРАЇНА

(19) UA (11) 81299 (13) C2  
(51) МПК (2006)  
A61K 31/196 (2006.01)  
A61K 39/395  
A61P 23/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ БОЛЮ ВВЕДЕННЯМ АНТИТІЛА ПРОТИ ФАКТОРА РОСТУ НЕРВІВ І НЕСТЕРОЇДНОГО ПРОТИЗАПАЛЬНОГО ЗАСОБУ І КОМПОЗИЦІЯ, ЩО ЇХ МІСТИТЬ**

1

2

(21) a200508778  
(22) 19.02.2004  
(24) 25.12.2007  
(86) PCT/US2004/005162, 19.02.2004  
(31) 60/448,823  
(32) 19.02.2003  
(33) US  
(31) 60/448,853  
(32) 19.02.2003  
(33) US  
(72) ШЕЛТОН ДЕВІД Л., ВЕРГАРА ДЖЕРМАН ДЖ.,  
ЛОО КЕРОЛ М.  
(73) РІНАТ НЬЮРОСАЙЄНС КОРП.  
(56) PETER ET AL CMAJ vol. 165, 2001, pages 1203  
- 1209  
WO 0178698 A2, 25.10.2001  
RO ET AL PAIN vol. 79, 1999, pages 265 - 274  
(57)

Спосіб лікування болю у індивідуума, що включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла проти фактора росту нервів (NGF) і НСПЗЗ, при якому антитіло проти (NGF) і НСПЗЗ у поєднанні забезпечуть ефективне полегшення болю.

1. Спосіб за п. 1, в якому НСПЗЗ вибраний з групи, що складається з ібупрофену, напроксену, напросину, диклофенаку, кетопрофену, толметину, суліндаку, мефенамової кислоти, меклофенамової кислоти, дифлунізалу, флуфенізалу, піроксикаму, судоксикаму, ізоксикаму, целекоксибу, рофекоксибу, DUP-697, флосулід, мелоксикаму, 6-метокси-2-нафтилоцтової кислоти, МК-966, набуметону, німезулід, NS-398, SC-5766, SC-58215, T-614.

2. Спосіб за п. 1, в якому НСПЗЗ являє собою ібупрофен.

3. Спосіб за пп. 1, 2 або 3, в якому антитіло проти NGF зв'язує людський NGF.

17.

4. Спосіб за п. 4, в якому антитіло проти NGF зв'язує людський NGF при афінитеті зв'язування приблизно 10 нМ або менше приблизно 10 нМ.

5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, в якому антитіло проти NGF являє собою людське антитіло.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, в якому антитіло проти NGF являє собою гуманізоване антитіло.

7. Спосіб за п. 7, в якому гуманізоване антитіло являє собою антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, показану в SEQ ID N0:1, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, показану в SEQ ID N0:2.

8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, в якому біль являє собою післяопераційний біль.

10. Спосіб за пунктом 1, де індивідуумом є людина.

11. Фармацевтична композиція для лікування болю у індивідуума, що включає ефективну кількість антитіла проти NGF і НСПЗЗ і фармацевтично прийнятний носій.

12. Фармацевтична композиція за п. 11, у якій антитіло проти NGF являє собою антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, показану в SEQ ID N0:1, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, показану в SEQ ID N0:2.

13. Фармацевтична композиція за пунктом 11, де індивідуумом є людина.

14. Набір для лікування болю у індивідуума, що включає антитіло проти NGF і НСПЗЗ і інструкції по введенню антитіла проти NGF в поєднанні з НСПЗЗ для лікування болю у індивідуума.

15. Набір за п. 14, у якому антитіло проти NGF являє собою антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, показану в SEQ ID N0:1, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, показану в SEQ ID N0:2.

16. Набір за п. 14, де індивідуумом є людина.

За цією заявкою вимагається пріоритет за попередніми заявками на видачу [патенту США № 60/448823, поданою 19 лютого 2003р., і 60/448853,

поданою 19 лютого 2003р.], які повністю включені в даний опис як посилання.

(13) C2  
(11) 81299  
(19) UA

Винахід відноситься до способів і композицій для профілактики або лікування болю у пацієнта введенням комбінації антагоніста фактора росту нервів і НСПЗЗ.

В даний час для полегшення болю рекомендується ряд способів лікування, що передбачають введення нестероїдних протизапальних засобів (НСПЗЗ). Було показано, що введення НСПЗЗ виявляє властивості полегшення болю. Однак відомі недоліки лікування НСПЗЗ, що включають небажані побічні ефекти, такі як подразнення шлунково-кишкового тракту і нирок і токсична дія на печінку. Більш того, НСПЗЗ не можуть досягнути адекватного полегшення болю навіть в їх максимальних терапевтично допустимих дозах при деяких хворобливих станах.

Фактор росту нервів (NGF) був першим ідентифікованим нейротропіном, і його роль в розвитку і виживанні і периферичних, і центральних нейронів була досить охарактеризована. Було показано, що NGF являє собою вирішальний фактор виживання і підтримки при розвитку периферичних симпатичних і ембріональних сенсорних нейронів і холінергічних нейронів основи переднього мозку [Smeeyne, et al., *Nature* 368:246-249 (1994); Creowley, et al., *Cell* 76:1001-1011 (1994)]. NGF здійснює стимулюючу регуляцію на експресію нейропептидів в сенсорних нейронах [Lindsay, et al., *Nature* 337:362-364 (1989)], і його активність опосередкована через 2 різних рецептори, зв'язаних з мембраною, рецептор TrkA тирозинкінази і рецептор p75, який структурно зв'язаний з іншими членами сімейства рецепторів фактора некрозу пухлин [Chao, et al., *Science* 232:518-521 (1986)].

У доповнення до його впливів на нервову систему, NGF все більше залучався до процесів поза нервовою системою. Наприклад, було показано, що екзогенно введений NGF посилює проникність судин [Otten, et al., *Eur. J. Pharmacol.* 106:199-201 (1984)], посилює T- і B-клітинні імунні відповіді [Otten, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 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. U.S.A.* 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)]. NGF продукується рядом типів клітин, включаючи тучні клітини [Leon, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3739-3743 (1994)], B-лімфоцити [Torcia, et al., *Cell* 85:345-356 (1996)], кератиноцити [Di Macro, et al., *J. Biol. Chem.* 268:22838-22846 (1993)], гладком'язеві 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 трубочки скелетних м'язів [Schwartz, et al., *J. Photochem. Photobiol. B* 66:195-200 (2002)]. Рецептори NGF були виявлені на різних типах клітин поза нервовою системою.

Наприклад, TrkA був виявлений на моноцитах, T- і B-лімфоцитах і тучних клітинах людини.

Зв'язок між підвищеними рівнями NGF і різними запальними станами спостерігався у пацієнтів, а також в декількох експериментальних моделях на тваринах. Ці запальні стани включають системний червоний вовчак [Bracci-Laudiero, et al., *Neuroreport* 4:563-565 (1993)], розсіяний склероз [Bracci-Laudiero, et al., *Neurisci. Lett.* 147:9-12 (1992)], псоріаз [Raychaudhuri, et al., *Acta Derm. L'enereol.* 78:84-86 (1998)], артрит [Falcimi, et al., *Ann. Rheum. Dis.* 55:745-748 (1996)], інтерстиціальний цистит [Okragly, et al., *J. Urology* 161:438-441 (1999)] і астму [Braun, et al., *Eur. J. Immunol.* 28:3240-3251 (1998)].

Отже підвищений рівень NGF в периферичних тканинах пов'язаний з гіперальгезією і запаленням, і він спостерігався при ряді форм артриту. Синовіальна оболонка пацієнтів, уражених ревматоїдним артритом, експресує високі рівні NGF в той час, як повідомлялося, що в незапаленій синовіальній оболонці 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 підвищені рівні NGF у трансгенних мишей з артритом нарівні із збільшенням кількості тучних кліток [Aloe, et al., *Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects* 15:139-143 (1993)].

Існують 2 загальні категорії медикаментозної терапії для лікування болю, причому кожна діє за допомогою різних механізмів і чинить різні ефекти, і вони обидві мають недоліки. Перша категорія включає нестероїдні протизапальні засоби (НСПЗЗ), які використовуються для лікування незначного болю, але терапевтичне застосування яких обмежене небажаними впливами на шлунково-кишковий тракт, такими як ерозія слизової оболонки шлунка, утворення пептичної виразки або запалення 12-палої кишки і товстої кишки і токсична дія на нирки при тривалому застосуванні. Друга категорія включає опіоїдні анальгетики, такі як морфін, які застосовуються для лікування болю від помірного до сильного, але терапевтичне застосування яких обмежене в зв'язку з небажаними ефектами, такими як закреп, нудота і блювота, пригнічення дихання, психічні порушення, ниркова коліка, стійкість до тривалого застосування і ризик розвитку залежності.

Очевидно, що існує необхідність в поліпшеному лікуванні болю, яке забезпечує поліпшену терапевтичну вигоду (наприклад, знижену силу і/або частоту болю) і/або знижує частоту виникнення небажаних побічних ефектів, викликаних багатьма сучасними схемами лікування.

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

Даний винахід заснований на відкритті того, що антагоністи NGF ефективні при лікуванні болю в поєднанні з НСПЗЗ. Така терапія приводить до несподівано посиленого лікування болю. Крім того, така терапія загалом забезпечує можливість

застосування зниженого дозування НСПЗЗ для отримання такої ж кількості зменшення болю і/або інших форм посилення лікування болю НСПЗЗ.

У першому аспекті даний винахід характеризує спосіб лікування (або в інших варіантах здійснення профілактики) болю, що включає введення деякої кількості антагоніста фактора росту нервів і деякої кількості НСПЗЗ так, що в поєднанні вони забезпечують ефективне полегшення болю. Відносні кількості і співвідношення антагоніста NGF і НСПЗЗ можуть варіюватися. У деяких варіантах здійснення вводиться кількість антагоніста NGF, достатня для того, щоб забезпечити можливість зниження звичайної дози НСПЗЗ, необхідної для отримання такого ж ступеня ефекту полегшення болю. У деяких варіантах здійснення вводиться кількість антагоніста NGF, достатня для того, щоб забезпечити можливість зниження звичайної дози НСПЗЗ, необхідної для отримання такого ж ступеня ефекту полегшення болю, щонайменше, приблизно на 5%, щонайменше, приблизно на 10%, щонайменше, приблизно на 20%, щонайменше, приблизно на 30%, щонайменше, приблизно на 40%, щонайменше, приблизно на 50%, щонайменше, приблизно на 60%, щонайменше, приблизно на 70%, щонайменше, приблизно на 80%, або, щонайменше, приблизно на 90%, або більше. Це зменшення може відбуватися з точки зору кількості, введеної в дане введення, і/або кількості, введеної протягом даного періоду часу (знижена частота).

В іншому аспекті винахід характеризує способи посилення лікування болю НСПЗЗ, що передбачають введення ефективної кількості НСПЗЗ в поєднанні з ефективною кількістю антагоніста NGF. Використовуваний в даному описі термін «введення в поєднанні» включає одночасне введення і/або введення в різний час. Введення в поєднанні також охоплює введення у вигляді спільної композиції (тобто антагоніст NGF і НСПЗЗ присутні (комбінуються) в одній і тій самій композиції) і/або введення у вигляді окремих композицій. Використовуваний в даному описі термін «введення в поєднанні» охоплює будь-яку обставину, при якій НСПЗЗ і антагоніст NGF вводяться в ефективній кількості індивідууму. Як далі обговорюється в даному описі, зрозуміло, що антагоніст NGF і НСПЗЗ можуть вводитися з різною частотою і/або інтервалами введення. Наприклад, антитіло проти NGF можна вводити 1 раз/тиждень, тоді як НСПЗЗ можна вводити частіше. Зрозуміло, що антагоніст NGF і НСПЗЗ можуть вводитися одним і тим самим шляхом введення або різними шляхами введення, і що різні схеми введення можуть змінюватися протягом ходу введення (введень). Введення може відбуватися перед початком болю.

В іншому аспекті винахід забезпечує способи зниження частоти виникнення болю, полегшення болю, зменшення болю і/або затримки розвитку або прогресування болю у індивідуума, причому вказані способи передбачають введення ефективної кількості антагоніста NGF в поєднанні з ефективною кількістю НСПЗЗ.

Способи винаходу прийнятні для лікування або профілактики будь-якого болю будь-якої етіології, включаючи біль, при якому загалом призначається застосування НСПЗЗ. У деяких варіантах здійснення біль являє собою післяопераційний біль. У деяких варіантах здійснення біль являє собою біль, пов'язаний з опіком. В інших варіантах здійснення біль являє собою біль, пов'язаний з ревматоїдним артритом. В інших варіантах здійснення біль являє собою біль, пов'язаний з остеоартритом.

Антагоніст NGF, прийнятний для застосування в способах винаходу, являє собою будь-який засіб, який може прямо або опосередковано привести до зниженої біологічної активності NGF. У деяких варіантах здійснення антагоніст NGF зв'язує (фізично взаємодіє з) NGF (наприклад, антитіло), зв'язується з рецептором NGF (таким як рецептор *trkA* і/або *p75*) і/або знижує (гальмує і/або блокує) низхідну передачу сигналів від рецепторів NGF (наприклад, інгібітори передачі сигналів кінази або іншої низхідної передачі сигналів, викликані NGF, в клітині-мішені). В інших варіантах здійснення антагоніст NGF інгібує (знижує) синтез і/або вивільнення NGF. В інших варіантах здійснення антагоніст NGF зменшує експресію або функцію рецепторів NGF *TrkA* і/або *p75*. В іншому варіанті здійснення антагоніст NGF являє собою антагоніст NGF, який не є імуноадгезином *TrkA* (тобто відрізняється від імуноадгезину *TrkA*). У деяких варіантах здійснення антагоніст NGF вибраний з будь-якого одного або більше з наступних: антитіло проти NGF, антисмислова молекула, направлена на нуклеїнову кислоту, що кодує NGF (включаючи антисмислову молекулу, направлену на нуклеїнову кислоту, що кодує NGF), антисмислова молекула, направлена на рецептори NGF (такі як *TrkA* і/або *p75*), речовину, що інгібує NGF, структурний аналог NGF, домінантно-негативна мутація рецептора *TrkA* і/або *p75*, яка зв'язує NGF, антитіло проти *TrkA*, антитіло проти *p75* і інгібітор кінази. У деяких варіантах здійснення антагоніст NGF (такий як антитіло проти NGF) зв'язує NGF (такий як hNGF) і значно не зв'язується із спорідненими нейротропінами, такими як NT-3, NT-4/5 і/або BDNF. В іншому варіанті здійснення антагоніст NGF являє собою антитіло проти NGF. У ще одних варіантах здійснення антитіло проти NGF специфічно зв'язується з NGF. У ще одних варіантах здійснення антитіло проти NGF розпізнає людський NGF. У ще одних варіантах здійснення антитіло проти NGF специфічно зв'язує людський NGF. У ще одних варіантах здійснення антитіло специфічно зв'язує той самий епітоп 6 NGF, що і антитіло, вибране з одного або більше з наступних: Mab 911, Mab 912 і Mab 938 [див. Hongo, et al., Hybridoma 19:215-227 (2000)]. У ще одних варіантах здійснення антитіло проти NGF гуманізоване (включаючи гуманізоване Mab 911, таке як антитіло E3, описане в даному описі). У ще одних варіантах здійснення антитіло проти NGF являє собою антитіло E3 (як описано в даному описі). В інших варіантах здійснення антитіло проти NGF включає один або більше CDR антитіла E3 (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 або, в деяких варіантах

здійснення, всі 6 CRD з E3). В інших варіантах здійснення антитіло проти NGF є людським. У ще одних варіантах здійснення антитіло проти NGF включає амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, показану в таблиці 1 (SEQ ID NO:1), і амінокислотну послідовність варіабельної області легкого ланцюга, показану в таблиці 2 (SEQ ID NO:2). У ще одних варіантах здійснення антитіло проти NGF включає амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, показану в таблиці 1 (SEQ ID NO:1). У ще одних варіантах здійснення антитіло проти NGF включає амінокислотну послідовність варіабельної області легкого ланцюга, показану в таблиці 2 (SEQ ID NO:2). У ще одних варіантах здійснення антитіло включає модифіковану константну область, таку як константна область, яка є імунологічно інертною, наприклад, не запускає лізис, опосередкований комплексом, або не стимулює антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність (ADCC). В інших варіантах здійснення константна область 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].

У деяких варіантах здійснення антагоніст NGF зв'язується з молекулою NGF. У ще одних варіантах здійснення антагоніст NGF являє собою антитіло, яке специфічно зв'язується з NGF. Однак антагоніст NGF може альтернативно зв'язуватися з рецептором TrkA. Антагоніст NGF може являти собою моноклональне антитіло проти людського NGF (анти-hNGF), яке здатне зв'язувати hNGF і ефективно інгібувати зв'язування hNGF з людським TrkA (hTrkA).

Афінітет зв'язування антитіла проти NGF з NGF (таким як hNGF) може складати від приблизно 0,10нМ до приблизно 0,75нМ, від приблизно 0,15нМ до приблизно 0,75нМ і від приблизно 0,18нМ до приблизно 0,72нМ. В одному варіанті здійснення афінітет зв'язування становить приблизно 2 пкМ і 22 пкМ. У деяких варіантах здійснення афінітет зв'язування становить приблизно 10нМ. В інших варіантах здійснення афінітет зв'язування складає менш, ніж приблизно 10нМ. В інших варіантах здійснення афінітет зв'язування становить приблизно 0,1нМ або приблизно 0,07нМ. В інших варіантах здійснення афінітет зв'язування складає менше за приблизно 0,1нМ або менше за приблизно 0,07нМ. В інших варіантах здійснення афінітет зв'язування становить приблизно 100нМ, приблизно 50нМ, приблизно 10нМ, приблизно 1нМ, приблизно 500пкМ, приблизно 100пкМ або приблизно від 50пкМ до будь-якого з приблизно 2пкМ, приблизно 5пкМ, приблизно 10пкМ, приблизно 15пкМ, приблизно 20пкМ, приблизно 40пкМ або приблизно 50пкМ. У деяких варіантах здійснення афінітет зв'язування складає будь-яку величину з приблизно 100нМ, приблизно 50нМ, приблизно 10нМ, приблизно 1нМ, приблизно 500пкМ, приблизно 100пкМ або приблизно 50пкМ або менше за приблизно 50пкМ. У деяких варіантах здійснення афінітет зв'язування складає менше, ніж будь-яка величина з 100нМ, приблизно 50нМ,

приблизно 10нМ, приблизно 1нМ, приблизно 500пкМ, приблизно 100пкМ або приблизно 50пкМ. У ще одних варіантах здійснення афінітет зв'язування становить приблизно 2пкМ, приблизно 5пкМ, приблизно 10пкМ, приблизно 15пкМ, приблизно 20пкМ, приблизно 40пкМ або більше за приблизно 40пкМ. Як добре відомо в даній галузі, афінітет зв'язування може бути виражений у вигляді  $K_D$  або константи дисоціації, і збільшений

афінітет зв'язування відповідає зниженій  $K_D$ . Афінітет зв'язування мишачого моноклонального антитіла 911 проти NGF [Hongo et al., Hybridoma 19:215-227 (2000)] з людським NGF становить приблизно 10нМ, а афінітет зв'язування гуманізованого антитіла проти NGF E3 (описаного в даному описі) з людським NGF становить приблизно 0,07нМ.

У випадках, коли антагоніст NGF являє собою антитіло, антитіло може являти собою фрагмент антитіла, включаючи фрагмент антитіла, вибраний з групи, що складається з фрагментів Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, діатіл, одноланцюгових молекул антитіла і мультиспецифічних антитіл, утворених з фрагментів антитіла, і одноланцюгової молекули Fv (scFv).

НСП33 може являти собою будь-яку нестероїдну протизапальну сполуку. НСП33 класифікуються за їх здатністю інгібувати циклооксигеназу. Циклооксигеназа 1 і циклооксигеназа 2 являють собою 2 основні ізоформи циклооксигенази, а найстандартніші НСП33 являють собою змішані інгібітори обох ізоформ. Найстандартніші НСП33 відносяться до однієї з наступних п'яти структурних категорій: (1) похідні пропіонової кислоти, такі як ібупрофен, напроксен, напросин, диклофенак і кетопрофен; (2) похідні оцтової кислоти, такі як толметин і сліндак; (3) похідні фенамової кислоти, такі як мефенамова кислота і меклофенамова кислота; (4) похідні біфенілкарбонової кислоти, такі як дифлунізал і флуфенізал; і (5) оксиками, такі як піроксим, судоксикам і ізоксикам.

Був описаний інший клас НСП33, які вибірково інгібують циклооксигеназу 2. Інгібітори Cox-2 були описані, наприклад, в [патентах США №№ 5616601; 5604260; 5593994; 5550142; 5536752; 5521213; 5475995; 5639780; 5604253; 5552422; 5510368; 5436265; 5409944 і 5130311], які всі включені в даний опис як посилання. Певні ілюстративні інгібітори COX-2 включають целекоксиб (SC-58635), рофекоксиб, DUP-697, флосулід (CGP-28238), мелоксикам, 6-метокси-2-нафтилоцтову кислоту (6-MNA), МК-966, набуметон (проліки для 6-MNA), нимезулід, NS-398, SC-5766, SC-58215, T-614; або їх комбінації.

У деяких варіантах реалізації винахід надає способи, в яких аспірин/або ацетомінофен застосовуються в поєднанні з антагоністом NGF (таким як антитіло проти NGF).

Антагоніст NGF і/або НСП33 можуть вводитися індивідууму будь-яким прийнятним шляхом. Наприклад, їх можна вводити разом або окремо і/або одночасно, і/або послідовно, перорально, внутрішньовенно, сублінгвально, підшкірно, внутрішньоартеріально, ректально, в

спинний мозок, інтраторакально, внутрішньоочеревинно, в шлуночки головного мозку, сублінгвально, трансдермально або шляхом інгаляції. Введення може бути системним, тобто внутрішньовенним або локалізованим.

У другому аспекті даний винахід характеризує композиції, що включають антагоніст фактора росту нервів і НСП33. Антагоніст фактора росту нервів і НСП33 можуть бути присутніми разом з одним або більше фармацевтично прийнятними носіями або ексципієнтами, або можуть бути присутніми в окремих композиціях. В іншому аспекті даний винахід надає синергічну композицію антагоніста NGF і НСП33.

У третьому аспекті даний винахід характеризує набір для застосування в будь-якому з способів, розкритих в даному описі, причому вказаний набір передбачає антагоніст NGF і НСП33. Набір може, крім того, включати інструкції для будь-якого з описаних в даному описі способів. Інструкції можуть включати введення антагоніста NGF (такого як антитіло проти NGF) в поєднанні з НСП33 (тобто одночасне введення і/або введення в різний час). У деяких варіантах здійснення антагоніст NGF і НСП33 упаковані разом, але вони можуть бути або можуть не бути в одному і тому самому контейнері. Так, в деяких варіантах здійснення набір включає антагоніст NGF і НСП33, присутні в одному і тому самому контейнері, і інструкції по застосуванню в будь-якому з описаних в даному описі способів. В інших варіантах здійснення набір включає антагоніст NGF і НСП33, що знаходяться в окремих контейнерах.

В інших варіантах здійснення винахід надає спосіб лікування болю у індивідуума, що передбачає введення індивідууму ефективної кількості антитіла проти фактора росту нервів (NGF) і НСП33. В інших варіантах здійснення НСП33 вибраний з групи, що складається з ібупрофену, напроксену, напросину, диклофенака, кетопрофену, толметину, сліндака, мефенамової кислоти, меклофенамової кислоти, дифлунізала, флуфенізала, піроксиму, судоксикаму, ізоксикаму, целекоксибу, рофекоксибу, DUP-697, флзуліді, мелоксикаму, 6-метокси-2-нафтилоцтової кислоти, МК-966, набуметону, німезуліді, NS-398, SC-5766, SC-58215, T-614. У деяких варіантах здійснення НСП33 є ібупрофеном. У деяких варіантах здійснення антитіло проти NGF зв'язує людський NGF. У деяких варіантах здійснення антитіло проти NGF зв'язує людський NGF з афінитетом зв'язування приблизно 10нМ або менш ніж приблизно 10нМ. У деяких варіантах здійснення антитіло проти NGF являє собою людське антитіло. У деяких варіантах здійснення антитіло проти NGF являє собою гуманізоване антитіло. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло являє собою антитіло, що включає варіабельну область важкого ланцюга, показану в SEQ ID NO:1 і варіабельну область легкого ланцюга, показану в SEQ ID NO:2. У деяких варіантах здійснення біль являє собою післяопераційний біль.

У деяких варіантах здійснення винахід забезпечує фармацевтичну композицію для лікування болю, що включає ефективну кількість

антитіла проти NGF і НСП33 і фармацевтично прийнятний носій.

У деяких варіантах здійснення винахід надає набір для лікування болю, що включає антитіло проти NGF, НСП33 і інструкції по введенню антитіла проти NGF в поєднанні з НСП33 для лікування болю.

Фіг.1 демонструє, що кумулятивна оцінка болю в балах знижена у тварин, що отримували лікування S[+]ібупрофеном в дозі 10 або 30мг/кг в комбінації з антагоністом NGF (антагоністом проти NGF Mab 911; [див. Kongo, et al., Hybridoma 19:215-227 (2000)]). Тварини були розділені на дві групи (контрольна і яка отримувала лікування антитілами). Антагоніст NGF вводили за 15 годин перед операцією, внутрішньоочеревинно (час = -15 годин) в дозі 1мг/кг. Операцію виконували, як описано у час 0. Біль у спокої оцінювали через 24 години після операції («0» на графіку). Потім всіх тварин лікували ібупрофеном (300мг/мл в 45% рідині бета-циклодекстрину) в концентрації 10мг/кг або 30мг/кг маси тіла. Тварин, що не отримували лікування антитілом, також лікували ібупрофеном в дозі 10мг/кг, 30мг/кг, 100мг/кг і 300мг/кг. Ібупрофен вводили підшкірно в задню частину шиї. Через 1 годину після введення дози ібупрофену оцінювали біль у спокої. Лікування антагоністом проти NGF плюс ібупрофеном більш ефективне в зменшенні болю, ніж лікування або одним ібупрофеном, або одним антитілом проти антагоніста NGF.

Фіг.2 являє собою графік, що показує кумулятивну оцінку болю в балах у тварин, що отримували лікування диклофенаком в дозі 5мг/кг, в комбінації з антагоністом NGF (антитіло Mab 911 проти антагоніста NGF; [див. Kongo, et al., Hybridoma 19:215-227 (2000)]). Тварини були розділені на дві групи (контрольна і що отримувала лікування антитілами). Антагоніст NGF вводили за 15 годин перед операцією, внутрішньоочеревинно (час = -15 годин) в дозі 1мг/кг. Операцію виконували, як описано у час 0. Біль у спокої оцінювали через 24 години після операції («0» на графіку). Потім всіх тварин лікували диклофенаком в дозі 5мг/кг маси тіла. Тварин, що не отримували лікування антитілом, також лікували диклофенаком в дозі 5мг/кг. Диклофенак вводили підшкірно в задню частину шиї.

Через 1 годину після введення диклофенака оцінювали біль у спокої.

Заявники виявили, що біль можна попередити або лікувати введенням ефективної кількості антагоніста NGF (такого як антитіло проти NGF) в поєднанні з НСП33. Способи і композиції даного винаходу можна використовувати для лікування або профілактики болю, включаючи будь-який біль, при якому загалом призначається застосування НСП33. Застосуванням антагоніста фактора росту нервів і НСП33 в поєднанні, відповідно до даного винаходу, тепер можна лікувати біль меншою дозою НСП33, знижуючи, за допомогою цього, імовірність побічних ефектів, пов'язаних з лікуванням НСП33. В деяких варіантах здійснення вводиться кількість антагоніста NGF, достатня для того, щоб

забезпечити можливість зниження звичайної дози НСПЗЗ, необхідної для отримання такого ж ступеня ефекту полегшення болю, щонайменше, приблизно на 5%, щонайменше, приблизно на 10%, щонайменше, приблизно на 20%, щонайменше, приблизно на 30%, щонайменше, приблизно на 50%, щонайменше, приблизно на 60%, щонайменше, приблизно на 70%, щонайменше, приблизно на 90%, або більше.

Лікування болю НСПЗЗ можна також посилити, як описано в даному описі, введенням НСПЗЗ в поєднанні з антагоністом NGF.

В одному аспекті винахід надає способи лікування або профілактики болю у індивідуума (такого як ссавець, і людина, і не людина), що передбачають введення ефективної кількості антагоніста NGF в поєднанні з ефективною кількістю НСПЗЗ. В іншому аспекті винахід надає способи посилення лікування або профілактики NSAD болю у індивідуума, що передбачають введення ефективної кількості антагоніста NGF (такого як антитіло проти NGF) в поєднанні з ефективною кількістю НСПЗЗ. В іншому аспекті винахід надає способи профілактики, полегшення і/або профілактики розвитку або прогресування болю.

У деяких варіантах здійснення антитіло проти NGF здатне зв'язувати NGF і ефективно інгібувати зв'язування NGF з його рецептором TrkA або p75 *in vivo*, або ефективно інгібувати активацію NGF його рецептора TrkA або p75. У деяких варіантах здійснення афінитет зв'язування антитіла проти NGF складає від приблизно 0,01 до приблизно 1,00нМ або від приблизно 0,05нМ до приблизно 0,25нМ. В інших варіантах здійснення афінитет зв'язування становить приблизно 1пкМ, приблизно 2пкМ, приблизно 5пкМ, приблизно 10пкМ, приблизно 15пкМ, приблизно 20пкМ, приблизно 50пкМ, приблизно 100пкМ, або більше. В одному варіанті здійснення афінитет зв'язування становить приблизно 2пкМ і 22пкМ. У деяких варіантах здійснення антитіло зв'язує по суті той самий епітоп 6 NGF, що і антитіло, вибране з одного або більше з наступних: Mab 911, Mab 912 і Mab 938 [див. Hongo, et al., Hybridoma 19:215-227 (2000)].

Антитіло може також являти собою фрагмент антитіла, такий як фрагмент антитіла, вибраний з одного або більше з наступних фрагментів: Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, діатіл, одноланцюгових молекул антитіла і мультиспецифічних антитіл, утворених з фрагментів антитіла, і одноланцюгової молекули Fv (scFv). Антитіло може також бути химерним, і воно може бути гуманізованим або людським. Антитіло може також бути біспецифічним.

Ілюстративні НСПЗЗ, які можна застосовувати в даному винаході, включають, але не обмежуються, (1) похідні пропіонової кислоти, такі як ібупрофен, напроксен, напросин, диклофенак і кетопрофен; (2) похідні оцтової кислоти, такі як толметин і сліндак; (3) похідні фенамової кислоти, такі як мефенамова кислота і меклофенамова кислота; (4) похідні біфенілкарбонової кислоти, такі як дифлунізал і флуфенізал; і (5) оксиками, такі як піроксим, судоксикам і ізоксикам. Був описаний інший клас НСПЗЗ, які вибірково

інгібують циклооксигеназу 2. Інгібітори Cox-2 були описані, наприклад, в [патентах США №№ 5616601; 5604260; 5593994; 5550142; 5536752; 5521213; 5475995; 5639780; 5604253; 5552422; 5510368; 5436265; 5409944 і 5130311], які всі включені в даний опис як посилання. Певні ілюстративні інгібітори COX-2 включають целекоксиб (SC-58635), рофекоксиб, DUP-697, флосулід (CGP-28238), мелоксикам, 6-метокси-2-нафтилоцтову кислоту (6-MNA), МК-966, набуметон (проліки для 6-MNA), німезулід, NS-398, SC-5766, SC-58215, T-614; або їх комбінації. У деяких варіантах здійснення аспірин і/або ацетомінофен застосовуються в поєднанні з антагоністом NGF (таким як антитіло проти NGF).

Способи і композиції даного винаходу можна застосовувати для лікування болю будь-якої етіології, включаючи гострий і хронічний біль, будь-який біль із запальним компонентом і біль, при якому звичайно призначаються НСПЗЗ. Приклади болю включають післяопераційний біль, біль після хірургічних втручань (включаючи зубний біль), мігрень, головний біль і невралгію трійчастого нерва, біль, пов'язаний з опіком, раною або нирковим каменем, біль, пов'язаний з травмою (включаючи травматичне пошкодження голови), нейропатичний біль, біль, пов'язаний з м'язово-скелетними розладами, такими як ревматоїдний артрит, остеоартрит, вісцеральний біль, коліт, панкреатит, гастрит, анкілозуючий спондиліт, серо-негативні (неревматоїдні) артропатії, не суглобовий ревматизм і навколосуглобові розлади і біль, пов'язаний з раком (включаючи «нападоподібний біль» і біль, пов'язаний з термінальними стадіями раку), периферичну нейропатію, постгерпетичну невралгію і біль, пов'язаний з серповидноклітинним кризом. Приклади болю із запальним компонентом (в доповнення до деяких з видів болю, описаних вище) включають ревматичний біль, біль, пов'язаний з мукозитом, і дисменорею. В деяких варіантах здійснення способи і композиції даного винаходу використовуються для лікування або профілактики післяопераційного болю і/або ракового болю. В інших варіантах здійснення біль являє собою більове показання, з приводу якого НСПЗЗ загалом не призначаються, такий як нейропатичний біль. В інших варіантах здійснення способи і композиції, описані в даному описі, використовуються для лікування і/або профілактики болю, пов'язаного з опіком. В інших варіантах здійснення способи і композиції, описані в даному описі, використовуються для лікування і/або профілактики болю, пов'язаного з ревматоїдним артритом. В інших варіантах здійснення способи і композиції, описані в даному описі, використовуються для лікування і/або профілактики болю, пов'язаного з остеоартритом.

В іншому аспекті винахід забезпечує композиції і набори для лікування болю, що включають антагоніст NGF (такий як антитіло проти NGF) і НСПЗЗ, прийнятні для застосування в будь-якому з способів, описаних в даному описі.

При відсутності інших вказівок, в практиці даного винаходу повинні використовуватися

звичайні методики молекулярної біології (включаючи рекомбінантні методики), мікробіології, клітинної біології, біохімії і імунології, які знаходяться в межах можливостей фахівців в даній галузі. Такі методики повністю пояснені в літературі, такий як [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 (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 (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)].

#### Визначення

«Антитіло» (що взаємозамінно використовується у множинній формі) являє собою молекулу імуноглобуліну, здатну специфічно зв'язуватися з мішенню, такою як вуглеводень, поліпептид, ліпід, поліпептид і т.д., за допомогою, щонайменше, однієї ділянки розпізнавання антигену, розташованого у варіабельній області молекули імуноглобуліну. Використовуваний в даному описі термін охоплює не тільки інтактні поліклональні або моноклональні антитіла, але також їх фрагменти (такі як Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, одноланцюговий (ScFv), їх мутанти, гібридні білки, що включають антитільну частину, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, діатіла, лінійні антитіла, одноланцюгові антитіла, мультиспецифічні 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, таке як IgG, IgA або IgM (або його підклас), і антитіло не повинно бути з якого-небудь конкретного класу. В залежності від амінокислотної послідовності антитіла константного домену його важких ланцюгів, імуноглобуліни можуть бути віднесені до різних класів. Існує 5 основних класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і декілька з них можливо, крім того, розділені на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і

IgA2. Константі домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобулінів, називаються відповідно альфа, дельта, епсилон, гамма і му. Структури субодиниць і тримірні конфігурації різних класів імуноглобулінів добре відомі.

«Моноклональне антитіло» відноситься до гомогенної популяції антитіл, в якій моноклональне антитіло складається з амінокислот (що природно зустрічаються і що зустрічаються штучно), які беруть участь у вибіркового зв'язуванні антигену. Моноклональні антитіла високо специфічні, причому вони направлені проти одного антигенного сайту. Термін «моноклональне антитіло» охоплює не тільки інтактні моноклональні антитіла і моноклональні антитіла повної довжини, але також їх фрагменти (такі як Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv,) одноланцюговий (ScFv), їх мутанти, гібридні білки, що включають антитільну частину, гуманізовані моноклональні антитіла, химерні моноклональні антитіла і будь-яку іншу модифіковану конфігурацію молекули імуноглобуліну, яка включає сайт розпізнавання антигену необхідної специфічності і здатності зв'язуватися з антигеном. Немає наміру обмежуватися відносно джерела антитіла або способу, яким воно отримане (наприклад, гібридомою, фаговою селекцією, рекомбінантною експресією, трансгенними тваринами і т.д.).

«Гуманізовані» антитіла відносяться до молекули, що має сайт зв'язування антигену, який по суті позбавлений імуноглобуліну з нелюдських видів, і іншу структуру імуноглобуліну молекули, засновану на структурі і/або послідовності людського імуноглобуліну. Сайт зв'язування антигену може включати або повні варіабельні домени, злиті на константні домени, або тільки області, що визначають комплементарність (CDR), трансплантовані на відповідні каркасні регіони у варіабельних доменах. Сайти зв'язування антигену можуть бути дикого типу або модифіковані одним або більше заміщеннями амінокислот, наприклад, модифіковані для того, щоб ближче нагадувати людський імуноглобулін. Деякі форми гуманізованих антитіл зберігають всі послідовності CDR (наприклад, гуманізоване мишаче антитіло, яке містить всі 6 CDR з мишачих антитіл). Інші форми гуманізованих антитіл мають одну або більше CDR (1, 2, 3, 4, 5, 6), які змінені відносно вихідного антитіла. У деяких випадках залишки каркасної області (FR) або інші залишки людського імуноглобуліну, заміщені відповідними нелюдськими залишками. Крім того, гуманізовані антитіла можуть включати залишки, які не виявляються в антитілі реципієнта або в антитілі донора.

Використовуваний в даному описі термін «фактор росту нервів» і «NGF» відноситься до фактора росту нервів і його варіантів (включаючи, наприклад, сплайсингові варіанти і варіанти білкової переробки), які мають, щонайменше, частину активності NGF. Термін "NGF", що використовується в даному описі, включає всі види нативної послідовності NGF ссавців,

включаючи людей, нелюдиноподібних мавп, собак, кішок, коней або корів.

«Рецептор NGF» відноситься до поліпептиду, який зв'язаний з NGF або активований ним. Рецептори NGF включають рецептор TrkA і рецептор p75 будь-якого виду ссавців, включаючи, але не обмежуючись, людей, собак, кішок, коней, приматів або корів.

«Антагоніст NGF» відноситься до будь-якої молекули, яка блокує, пригнічує або знижує (включаючи значно) біологічну активність NGF, включаючи низхідні шляхи, опосередковані передачею сигналів NGF, такі як зв'язування з рецепторами і/або викликана клітинна реакція на NGF. Термін «антагоніст» не має на увазі якого-небудь специфічного механізму біологічної дії, і вважається, що він явно включає і охоплює всі можливі фармакологічні, фізіологічні і біохімічні взаємодії з NGF, і прямі, і опосередковані, або які взаємодіють з NGF, його рецептором, або за допомогою іншого механізму, і його наслідки, які можуть бути досягнуті різними і хімічно різнорідними композиціями. Ілюстративні антагоністи NGF включають, але не обмежуються, антитіло проти NGF, антисмисловою молекулу, направлену на NGF (включаючи антисмисловою молекулу, направлену на нуклеїнову кислоту, що кодує NGF), сполуку, що інгібує NGF, структурний аналог NGF, домінантно-негативну мутацію рецептора TrkA, яка зв'язує NGF, і імунoadгезин TrkA, антитіло проти p75, антисмисловою молекулу, направлену на будь-який або обидва з рецепторів TrkA і/або p75 (включаючи, антисмисловою молекулу, направлену на нуклеїнову кислоту, що кодує TrkA або p75) і інгібітор кінази. Для мети даного винаходу потрібно ясно розуміти, що термін «антагоніст» охоплює всі раніше ідентифіковані терміни і функціональні стани і характеристики, за допомогою яких сам NGF, біологічна активність NGF (включаючи, але не обмежуючи його здатність опосередковувати будь-який аспект болю) або послідовності біологічної активності по суті анулюються, зменшуються або нейтралізуються будь-якою значною мірою. У деяких варіантах здійснення антагоніст NGF зв'язує (фізично взаємодіє) з NGF (наприклад, антитіло), зв'язується з рецептором NGF (таким як рецептор TrkA або рецептор p75) і/або знижує (гальмує і/або блокує) низхідну передачу сигналів рецептора NGF, і/або інгібує (знижує) синтез, продукцію або вивільнення NGF. У деяких варіантах здійснення антагоніст NGF зв'язує (фізично взаємодіє) з NGF (наприклад, антитіло), зв'язується з рецептором NGF (таким як рецептор TrkA або рецептор p75) і/або знижує (гальмує і/або блокує) низхідну передачу сигналів рецептора NGF. В іншому варіанті здійснення антагоніст NGF зв'язується з NGF і запобігає димеризації рецептора TrkA і/або аутофосфорилуванню TrkA. В інших варіантах антагоніст NGF інгібує або знижує синтез NGF. В інших варіантах здійснення антагоніст NGF інгібує або знижує синтез і/або продукцію (вивільнення). Приклади типів антагоністів NGF надані в даному описі.

Використовуваний в даному описі термін «антитіло проти NGF» відноситься до антитіла, яке

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

«Імунoadгезин TrkA» відноситься до розчинної химерної молекули, що включає фрагмент рецептора TrkA, наприклад, позаклітинний домен рецептора TrkA і послідовність імунoglobуліну, 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-яку одну або більше з наступних: здатність зв'язувати рецептори NGF (такі як p75 і/або TrkA); здатність сприяти димеризації і/або аутофосфорилуванню рецепторів TrkA; здатність активувати шляхи передачі сигналів рецепторів NGF; здатність сприяти клітинному диференціюванню, проліферації, виживанню, росту та іншим змінам клітинної фізіології, включаючи (у разі нейронів, включаючи периферичні і центральні нейрони) зміну морфології нейронів, синаптогенез, синаптичну функцію, вивільнення нейромедіаторів і/або нейропептидів і регенерацію після пошкодження і здатність опосередковувати біль.

Термін «епітоп» використовується для позначення сайтів зв'язування для (моноклональних або поліклональних) антитіл на антигенах, таких як білкові антигени.

Термін «лікування», що використовується в даному описі, являє собою підхід для отримання сприятливих або бажаних клінічних результатів. Для цілей даного винаходу сприятливі або бажані клінічні результати включають, але не обмежуються, один або більше з наступних: ослаблення або полегшення будь-якого аспекту болю, включаючи гострий, хронічний, запальний, нейропатичний або післяопераційний біль. Для цілей даного винаходу сприятливі або бажані клінічні результати включають, але не обмежуються, один або більше з наступних: включаючи зменшення тяжкості, полегшення одного або більше симптомів, пов'язаних з болем, включаючи будь-який аспект болю (такий як зменшення тривалості болю і/або зменшення больової чутливості або больового відчуття).

«Зниження частоти виникнення» болю означає будь-яке зниження тяжкості (що може включати зниження необхідності і/або кількості (наприклад, впливу) інших засобів і/або способів лікування, що загалом використовуються з приводу цих станів, тривалості і/або частоти (включаючи, наприклад, затримку або збільшення часу до виникнення болю у індивідуума). Як зрозуміло фахівцям в даній галузі, індивідууми можуть варіюватися з точки зору їх реакції на лікування, і також, наприклад, «спосіб зниження частоти виникнення болю у індивідуума» відображає введення антагоніста NGF, описаного в даному описі, в поєднанні з НСПЗЗ, як описано в даному описі, на основі доцільного очікування, що таке введення може, ймовірно, спричинити таке зменшення частоти виникнення у цього конкретного індивідуума.



«Полегшення» болю або одного або більше симптомів болю означає зменшення або пом'якшення одного або більше симптомів болю, в порівнянні з відсутністю введення антагоніста NGF в поєднанні з НСПЗЗ. «Полегшення» також включає покоротшання або зменшення тривалості симптому.

«Пом'якшення» болю або одного або більше симптомів болю означає зменшення ступеня одного або більше небажаних клінічних проявів болю у індивідуума або популяції індивідуумів, що отримували лікування антагоністом NGF в поєднанні з НСПЗЗ відповідно до винаходу.

Використовуваний в даному описі термін «затримка» розвитку болю означає відстрочення, перешкоджання, сповільнення, затримку, стабілізацію і/або відкладене прогресування болю. Ця затримка може бути різної тривалості, в залежності від анамнезу захворювання і/або індивідуумів, що одержують лікування. Як очевидно для фахівця в даній галузі, достатня або значна затримка може насправді охоплювати профілактику в тому, що у індивідуума не розвивається біль. Спосіб, який «затримує» розвиток симптому, являє собою спосіб, який знижує імовірність розвитку симптому в даній часовій рамці і/або знижує ступінь симптомів в даній часовій рамці, в порівнянні з відсутністю застосування способу. Такі порівняння звичайно засновані на клінічних дослідженнях з використанням статистично значущої кількості індивідуумів.

«Розвиток» або «прогресування» болю означає вихідні прояви і/або наступне прогресування розладу. Розвиток болю може бути виявлений і оцінений з використанням стандартних клінічних методик, які добре відомі в даній галузі. Однак розвиток також відноситься до прогресування, яке може бути таким, що не виявляється. З метою даного винаходу, розвиток або прогресування відноситься до біологічного перебігу симптомів. «Розвиток» включає виникнення, рецидив і початок. Використовуваний в даному описі термін «початок» або «виникнення» болю включає вихідний початок і/або рецидив.

«Ефективна кількість» являє собою кількість, достатню для отримання сприятливих або бажаних клінічних результатів, включаючи полегшення або зниження больового відчуття. Для цілей даного винаходу, ефективна кількість антагоніста NGF (такого як антитіло проти NGF) і НСПЗЗ включає кількість, достатню для лікування, полегшення, зниження інтенсивності або профілактики болю (включаючи сприйняття болю і відчуття болю) будь-якого типу, включаючи гострий, хронічний, запальний, нейропатичний або післяопераційний біль. У деяких варіантах здійснення ефективну кількість НСПЗЗ і антагоніста NGF, здатну модулювати поріг чутливості до зовнішніх стимулів до рівня, порівнянного з рівнем, що спостерігається у здорових індивідуумів. В інших варіантах здійснення цей рівень може не бути порівняним з рівнем, що спостерігається у здорових індивідуумів, але знижений, в порівнянні з

індивідуумами, що не отримували комбіновану терапію. Ефективна кількість антагоніста NGF також охоплює кількість антагоніста NGF, достатню для посилення лікування болю НСПЗЗ (терапевтичного ефекту), як описано в даному описі, або для зниження дози НСПЗЗ, необхідної для лікування або профілактики болю, як описано в даному описі. Відповідно до уявлень в даній галузі, ефективна кількість антагоніста NGF в поєднанні з НСПЗЗ може варіюватися, нарівні з іншими причинами, в залежності від типу болю (і анамнезу пацієнта, а також інших чинників, таких як тип (і/або дозування) або використовуваного антагоніста NGF і/або НСПЗЗ). Ефективна кількість в контексті даного винаходу може також являти собою таку кількість антагоніста NGF і НСПЗЗ, при якій досягається синергізм. Ефективна кількість антагоніста в контексті даного винаходу загалом означає кількість, достатню для того, щоб привести до посилення терапевтичного ефекту НСПЗЗ, що застосовується по підведенню болю (що, в свою чергу, означає, що знижена доза і/або спостерігається який-небудь інший сприятливий ефект) і/або привести до сприятливого ефекту, в порівнянні з лікуванням одним НСПЗЗ. «Ефективна кількість» антагоніста NGF може також привести до синергічного ефекту, в порівнянні з введенням з одним антагоністом NGF або НСПЗЗ.

«Індивідуум» є хребетним, переважно, ссавцем, переважніше, людиною. Ссавці включають, але не обмежуються, сім'якогосподарських тварин, спортивних тварин, домашніх тварин, приматів, коней, корів, собак, мишей і щурів.

Термін «НСПЗЗ» відноситься до нестероїдної протизапальної сполуки. НСПЗЗ діляться на категорії в залежності від їх здатності інгібувати циклооксигеназу. Циклооксигеназа 1 і циклооксигеназа 2 являють собою дві основні ізоформи циклооксигенази, і більшість стандартних НСПЗЗ являють собою змішані інгібітори цих двох ізоформ. Більшість стандартних НСПЗЗ відносяться до однієї з наступних п'яти структурних категорій: (1) похідні пропіонової кислоти, такі як ібупрофен, напроксен, напросив, диклофенак і кетопрофен; (2) похідні оцтової кислоти, такі як толметин і спіндак; (3) похідні фенамової кислоти, такі як мефенамова кислота і меклофенамова кислота; (4) похідні біфенілкарбонової кислоти, такі як дифлунізал і флуфенізал; і (5) оксиками, такі як піроксим, судоксикам і ізоксикам.

Був описаний інший клас НСПЗЗ, які вибірково інгібують циклооксигеназу 2. Інгібітори COX-2 були описані, наприклад, в [патентах США №№ 5616601; 5604260; 5593994; 5550142; 5536752; 5521213; 5475995; 5639780; 5604253; 5552422; 5510368; 5436265; 5409944 і 5130311], які всі включені в даний опис як посилання. Певні ілюстративні інгібітори COX-2 включають целекоксиб (SC-58635), рофекоксиб, DUP-697, флорулід (CGP-28238), мелоксикам, 6-метокси-2-нафтилоцтову кислоту (6-MNA), МК-966, набуметон (проліки для 6-MNA), нимезулід, NS-398, SC-5766, SC-58215, T-614; або їх комбінації.

У деяких варіантах здійснення аспірин і/або ацетомінофен застосовуються в поєднанні з антагоністом NGF (таким як антитіло проти NGF). Аспірин являє собою інший тип нестероїдної протизапальної сполуки.

Використовуваний в даному описі термін «в поєднанні» включає одночасне введення і/або введення в різний час. Введення в поєднанні також охоплює введення у вигляді спільної композиції (тобто антагоніст NGF і НСПЗЗ присутні (комбінуються) в одній і тій самій композиції) і/або введення у вигляді окремих композицій. Використовуваний в даному описі термін «введення в поєднанні» призначений охоплювати будь-яку обставину, при якій НСПЗЗ і антагоніст NGF вводяться в ефективній кількості індивідууму, яке може відбуватися одночасно і/або окремо. Як далі обговорюється в даному описі, зрозуміло, що антагоніст NGF і НСПЗЗ можуть вводитися з різною частотою і/або інтервалами введення. Наприклад, антитіло проти NGF можна вводити 1 раз/тиждень, тоді як НСПЗЗ можна вводити частіше. Зрозуміло, що антагоніст NGF і НСПЗЗ можуть вводитися одним і тим самим шляхом введення або різними шляхами введення.

«Післяопераційний біль» (що взаємозамінно іменується «болем після розрізу» або «посттравматичним болем») відноситься до болю, який виникає або походить від зовнішньої травми, такої як поріз, прокол, розріз, розрив або рана тканини індивідуума (включаючи біль, який виникає внаслідок хірургічних процедур, інвазивних, або не інвазивних). Термін «післяопераційний біль», що використовується в даному описі, не включає біль, який виникає (з'являється або відбувається) без зовнішньої фізичної травми. У деяких варіантах здійснення післяопераційний біль є внутрішнім або зовнішнім (включаючи периферичний) болем, і рана, поріз, травма, розрив або розріз можуть виникнути випадково (як при травматичній рані) або умисно (як при операційному розрізі). Використовуваний в даному описі термін «біль» включає сприйняття болю і відчуття болю, і біль можна оцінювати об'єктивно з використанням бальних оцінок болю та інших способів, добре відомих в даній галузі. Використовуваний в даному описі термін «післяопераційний біль» включає алодинію (тобто підвищену реакцію (тобто сприйняття болю) у відповідь на звичайно не больовий подразник) і гіпералгію (тобто підвищену реакцію на звичайно больовий або неприємний подразник), які, в свою чергу, можуть бути термічними або механічними (тактильними) за природою. В деяких варіантах здійснення біль характеризується термічною чутливістю, механічною чутливістю і/або болем в спокої. В деяких варіантах здійснення післяопераційний біль включає механічно викликаний біль або біль в спокої. В інших варіантах здійснення післяопераційний біль включає біль в спокої.

Лікування болю НСПЗЗ «посилюється», коли аспект лікування НСПЗЗ поліпшується (в порівнянні з введенням НСПЗЗ без введення антагоніста NGF). Наприклад, ефективність лікування НСПЗЗ можна збільшити в присутності

антагоніста NGF відносно ефективності НСПЗЗ у відсутність антагоніста NGF. Як інший приклад, лікування або профілактика болю НСПЗЗ може бути «посилена» застосуванням антагоніста NGF в поєднанні з НСПЗЗ, коли це застосування забезпечує можливість кращого полегшення болю (наприклад, коли застосовується доза НСПЗЗ, яка не забезпечує можливість ефективного лікування або профілактики болю).

Відносно всіх способів, описаних в даному описі, посилення на антагоніста NGF і НСПЗЗ також включають композиції, що включають одне або декілька цих засобів. Даний винахід можна застосовувати для лікування болю у індивідуумів, що включають всіх ссавців, і людини, і не людини.

В одному аспекті винахід надає способи лікування болю у індивідуума, що включають введення ефективної кількості антагоніста NGF (такого як антитіло проти NGF) в поєднанні з ефективною кількістю НСПЗЗ. В деяких варіантах здійснення вводиться кількість антагоніста NGF, достатня для того, щоб забезпечити можливість зниження звичайної дози НСПЗЗ, необхідної для отримання такого ж ступеня ефекту полегшення болю, щонайменше, приблизно на 5%, щонайменше, приблизно на 10%, щонайменше, приблизно на 20%, щонайменше, приблизно на 30%, щонайменше, приблизно на 50%, щонайменше, приблизно на 60%, щонайменше, приблизно на 70%, щонайменше, приблизно на 80%, або, щонайменше, приблизно на 90%, або більше.

В іншому аспекті винахід надає способи посилення лікування болю НСПЗЗ у індивідуума, що передбачають введення ефективної кількості антагоніста NGF в поєднанні з ефективною кількістю НСПЗЗ.

У деяких варіантах здійснення біль включає один або декілька з наступних: гострий і/або хронічний біль, будь-який біль із запальним компонентом, післяопераційний біль (включаючи зубний біль), мігрень, головний біль і невралгію трійчастого нерва, біль, пов'язаний з опіком, раною або нирковим каменем, біль, пов'язаний з травмою (включаючи травматичне пошкодження голови), нейропатичний біль, біль, пов'язаний з серповидноклітинним кризом, біль, пов'язаний з дисменореєю або кишковою дисфункцією, і біль, пов'язаний з раком (включаючи «нападоподібний біль» і біль, пов'язаний з термінальними стадіями раку). В інших варіантах здійснення біль являє собою біль, який звичайно лікують НСПЗЗ (таким як ібупрофен). В інших варіантах здійснення біль пов'язаний з опіком. В інших варіантах здійснення біль пов'язаний з ревматоїдним артритом. В інших варіантах здійснення біль пов'язаний з остеоартритом.

В іншому аспекті винахід надає способи профілактики, полегшення і/або профілактики розвитку або прогресування болю. Так, в деяких варіантах здійснення, антагоніст NGF, такий як антитіло проти NGF, і/або НСПЗЗ вводяться перед болісною подією (такою як операція). Наприклад, антагоніст NGF можна ввести за 30 хвилин, за 1 годину, за 5 годин, за 10 годин, за 15 годин, за 24 години або навіть більше, наприклад, за 1 день,

декілька днів або навіть 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні або більше перед видами активності, які, ймовірно, приведуть або пов'язані з ризиком викликаного болю, такі як зовнішня травма або операція.

Лікування або профілактика болю оцінюється з використанням способів, добре відомих в даній галузі. Оцінку можна виконувати на основі об'єктивного показника, такого як спостереження поведінки, такої як реакція на подразники, вирази обличчя і тому подібні. Оцінка може бути також заснована на суб'єктивних показниках, таких як характеристика пацієнтом болю 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].

Діагностика і оцінка болю при ревматоїдному артриті добре встановлена в даній галузі. Оцінку можна виконати на основі показників, відомих в даній галузі, таких як характеристика пацієнтом болю 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]. Існують також шкали вимірювання патологічного стану, що звичайно використовуються, такі як [the American College of Rheumatology (ACR) (Felson, et al., Arthritis and Rheumatism (1993) 36 (6): (729-740), the Health Assessment Questionnaire (HAQ) (Fries, et al., (1982) J. Rheumatol. 9:789-793), the Paulus Scale (Paulus, et al., Arthritis and Rheumatism (1990) 33: 477-484), and the Arthritis Impact Measure Scale (AIMS) (Meenam, et al., Arthritis and Rheumatology (1982) 25(10):1048-1053)].

Діагностика та оцінка болю при остеоартриті добре встановлена в даній галузі. Оцінку можна виконати на основі показників, відомих в даній галузі, таких як характеристика пацієнтом болю 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]. Наприклад, шкалу WOMAC болю при підйомі після операції (включаючи біль, тугорухливість і фізичну функцію) і 100мм зорову аналогову шкалу (VAS) можна використати для оцінки болю і оцінки реакції на лікування.

Зрозуміло, що коли антагоніст NGF (такий як антитіло проти NGF) і НСП33 вводяться в поєднанні, або у вигляді однієї, або окремої композиції (композицій), антагоніст фактора росту нервів і НСП33 представлені у співвідношенні, яке узгоджується з виявом бажаного ефекту. В деяких варіантах здійснення співвідношення по масі між антагоністом фактора росту нервів і НСП33 може становити приблизно 1 до 1. В деяких варіантах здійснення співвідношення може складати від приблизно 0,001 до приблизно 1 і від приблизно 1000 до приблизно 1, від приблизно 0,01 до приблизно 1 і від приблизно 100 до приблизно 1, або від приблизно 0,1 до приблизно 1 і від приблизно 10 до приблизно 1. Передбачені інші співвідношення.

Потрібно розуміти, що кількість антагоніста фактора росту нервів і НСП33, необхідна для застосування при лікуванні або профілактиці болю, буде варіюватися не тільки в залежності від

вибраних конкретних сполук або композицій, але також від шляху введення, природи стану, що підлягає лікуванню, і віку і стану пацієнта, і, зрештою, буде вибиратися за розсудом лікуючого лікаря.

#### Антагоністи NGF

У способах винаходу використовується антагоніст NGF, який відноситься до будь-якої молекули, яка блокує, пригнічує або знижує (включаючи значно) біологічну активність NGF, включаючи низхідні шляхи, опосередковані передачею сигналів NGF, такі як зв'язування з рецепторами і/або клітинна реакція, викликана NGF. Термін «антагоніст» не має на увазі специфічний механізм безвідносної біологічної дії, і вважається, що він явно включає і охоплює всі можливі фармакологічні, фізіологічні і біохімічні взаємодії з NGF і їх наслідки, які можуть бути досягнуті різноманітними різними і такими, що хімічно відрізняються, композиціями. Ілюстративні антагоністи NGF включають, але не обмежуються, антитіло проти NGF, поліпептид (включаючи поліпептид, що включає домен, що зв'язує NGF, отриманий з антитіла проти NGF, наприклад, зв'язувальний домен, що включає області CDR, достатні для зв'язування NGF), антисмислової молекулу, направлену на NGF (включаючи антисмислової молекулу, направлену на нуклеїнову кислоту, що кодує NGF), антисмислової молекулу, направлену на обидва рецептори TrkA і/або p75 (включаючи антисмислові молекули, направлені на молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує TrkA або p75), сполуку, яка інгібує NGF, структурний аналог NGF, домінантно-негативну мутацію рецептора TrkA і/або p75, яка зв'язує NGF, антитіло проти TrkA, який зв'язує NGF, імуоадгезин TrkA, антитіло проти TrkA, антитіло проти p75 і інгібітор кінази. Для мети даного винаходу потрібно чітко розуміти, що термін «антагоніст» охоплює раніше ідентифіковані терміни, назви і функціональні стани і характеристики, за допомогою яких сам NGF, біологічна активність NGF (включаючи, але не обмежуючись, здатність опосередковувати будь-який аспект болю) або наслідки біологічної активності по суті анулюється, зменшується або нейтралізується в будь-якій значній мірі. У деяких варіантах здійснення антагоніст NGF (наприклад, антитіло проти NGF) зв'язує (фізично взаємодіє з) NGF, зв'язується з рецептором NGF (таким як рецептор TrkA і/або p75) і/або знижує і/або блокує) низхідну передачу сигналів рецептора NGF. Відповідно, в деяких варіантах здійснення антагоніст NGF зв'язує (фізично взаємодіє з) NGF. В інших варіантах здійснення антагоніст NGF зв'язується з рецептором NGF (таким як рецептор TrkA і/або p75).

В інших варіантах здійснення антагоніст знижує (гальмує і/або блокує) низхідну передачу сигналів рецептора NGF (наприклад, передачу сигналів інгібіторів кінази). В інших варіантах здійснення антагоніст інгібує (знижує) синтез і/або вивільнення NGF. В іншому варіанті здійснення антагоніст NGF являє собою імуоадгезин TrkA. В іншому варіанті здійснення антагоніст NGF відрізняється від антитіла проти NGF. В деяких

варіантах здійснення антагоніст NGF зв'язує NGF (такий як hNGF) і значно не зв'язується із спорідненими нейротропінами, такими як NT-3, NT-4/5 і/або BDNF. В деяких варіантах здійснення антагоніст зв'язує людський NGF і значно не зв'язує NGF від інших видів хребетних (в деяких варіантах здійснення ссавців). В деяких варіантах здійснення антагоніст NGF зв'язує людський NGF, а також один або декілька NGF від інших видів хребетних (в деяких варіантах здійснення ссавців). В деяких варіантах здійснення антагоніст NGF зв'язує NGF, а також, щонайменше, один інший нейротропін. В деяких варіантах здійснення антагоніст NGF зв'язується з NGF видів ссавців, таких як кінь або собака, але значно не зв'язується з NGF від інших видів ссавців.

#### Антитіла проти NGF

У деяких варіантах здійснення винаходу антагоніст NGF включає антитіло проти NGF. Антитіло проти NGF повинно проявляти будь-яку одну або декілька з наступних характеристик: (а) зв'язування з NGF і інгібування біологічної активності NGF і/або нижхідного шляху (шляхів), опосередкованого функцією передачі сигналів NGF; (б) лікування або профілактика будь-якого аспекту болю, зокрема, в поєднанні з НСПЗЗ; (с) блокада або зменшення активації рецепторів NGF (включаючи димеризацію і/або аутофосфорилування рецепторів trkA); (д) збільшення виведення NGF; (е) посилення лікування болю НСПЗЗ.

Антитіла проти NGF відомі в даній галузі [див., наприклад, заявки PCT № WO 02096458; 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); номери доступу GenBank U39608, U39609, L17078 або L17077].

В деяких варіантах здійснення антитіло проти NGF специфічно зв'язується з NGF. У ще одних варіантах здійснення антитіло є гуманізованим (таким як описане в даному описі антитіло E3). У деяких варіантах здійснення антитіло проти NGF являє собою антитіло E3 (як описано в даному описі). В інших варіантах здійснення антитіло проти NGF включає один або більше CDR антитіла E3 (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 або, в деяких варіантах здійснення, всі 6 CRD з E3). В інших варіантах здійснення антитіло проти NGF є людським. У ще одних варіантах здійснення антитіло проти NGF включає амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, показану в таблиці 1 (SEQ ID NO:1), і амінокислотну послідовність варіабельної області легкого ланцюга, показану в таблиці 2 (SEQ ID NO:2). У ще одних варіантах здійснення антитіло проти NGF включає амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, показану в таблиці 1 (SEQ ID NO:1). У ще одних варіантах здійснення антитіло проти NGF включає амінокислотну послідовність варіабельної області легкого ланцюга, показану в таблиці 2 (SEQ ID NO:2). У ще одних варіантах здійснення антитіло включає модифіковану константну область, таку як константна область, яка є імунологічно інертною, наприклад, не запускає лізис, опосередкований комплементом,

або не стимулює антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність (ADCC). В інших варіантах здійснення константна область 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]. В інших варіантах здійснення антитіло проти NGF являє собою будь-яке антитіло, описане в заявці на [патент США під серійним № 10/745775].

У деяких варіантах здійснення антитіло проти NGF являє собою гуманізоване мишаче моноклональне антитіло проти NGF, зване антитілом «E3», яке включає константну область 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]); капа константної області людського легкого ланцюга і варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів, показані в таблиці 1 і 2.

Таблиця 1

#### Варіабельна область важкого ланцюга

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDNLNWIQPPGKLEWIGHWGDGTT  
DYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKSSVTAADTA VVYCARGGY WYATSYFYFDVY  
GGTLVTVS (SEQ ID NO:1).

Таблиця 2

#### Варіабельна область легкого ланцюга

DIQM TQSPSSLASVGDRTITCRASQISNNLNWYQKPGKAPKLLIYYTSRFHS  
GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQSEHTLPYTFGGQTKLEIKRT (SEQ  
ID NO:2).

Наступні поліпептиди, що кодують варіабельну область важкого ланцюга E3 або легкого ланцюга E3, були депоновані в ATCC 8 січня 2003р.:

Матеріал		N
Вектор Eb.911.3E	варіабельна область легкого ланцюга E3	P
Вектор Eb.pur.911.3E	варіабельна область легкого ланцюга E3	P
Вектор Db.911.3E	варіабельна область важкого ланцюга E3	P

Вектор Eb.911.3E являє собою поліпептид, що кодує варіабельну область легкого ланцюга, показаного в таблиці 2; Вектор Eb.pur.911.3E являє собою поліпептид, що кодує, варіабельну область легкого ланцюга, показаного в таблиці 2, і Вектор Db.911.3E являє собою поліпептид, що кодує варіабельну область важкого ланцюга, показаного в таблиці 1. Ці поліпептиди також кодують константні домени.

Існує, щонайменше, дві методики для визначення CDR: (1) підхід, заснований на перехресно-видовій мінливості послідовностей [(тобто Rabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md)]; і (2) підхід, заснований на кристалографічних дослідженнях комплексів антиген-антитіло [Chothia et al. (1989) Nature 342:877; Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948]]. Використовуваний в даному описі термін «CDR» може відноситися до CDR,

визначених будь-яким підходом або комбінацією обох підходів.

В іншому варіанті здійснення антитіло проти NGF включає один або декілька CDR антитіла E3 (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 або в деяких варіантах здійснення всі 6 CDR з E3). Визначення областей CDR досить відоме в даній галузі. CDR можуть являти собою Kabat, Chothia або комбінацію Kabat і Chothia.

Антитіла, які можна застосовувати в даному винаході, можуть охоплювати моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, фрагменти антитіл (наприклад, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc і т.д.), химерні антитіла, біспецифічні антитіла, гетерокон'югатні антитіла, одноланцюгові (ScFv), їх мутанти, гібридні білки, що включають антитільну частину, гуманізовані антитіла і будь-яку 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 мишачими, щурячими, людськими або будь-якого іншого походження (включаючи химерні і гуманізовані антитіла). Для цілей даного винаходу антитіло взаємодіє з NGF таким чином, який інгібує NGF і/або низхідні шляхи, опосередковані функцією передачі сигналів NGF. В одному варіанті здійснення антитіло являє собою людське антитіло, яке розпізнає один або декілька епітопів на людському NGF. В іншому варіанті здійснення антитіло являє собою мишаче або щуряче антитіло, яке розпізнає один або декілька епітопів на людському NGF. В іншому варіанті здійснення антитіло розпізнає один або декілька епітопів на NGF, вибраному з групи, що складається з: гризунів, собак, кішок, коней і корів. В іншому варіанті здійснення антитіло включає модифіковану константну область, таку як константна область, яка є імунологічно інертною (тобто не запускає опосередкований комплементом лізис) або не стимулює антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність (ADCC). Активність ADCC можна оцінити з використанням способів, розкритих в [патенті США №5500362]. В інших варіантах здійснення константна область модифікована, як описано в [Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-1624; публікації 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 0,01нМ до приблизно 1нМ, від приблизно 0,05нМ до приблизно 0,25нМ, від приблизно 0,10нМ до приблизно 0,80нМ, від приблизно 0,15нМ до приблизно 0,75нМ і від приблизно 0,18нМ до приблизно 0,72нМ. В інших варіантах здійснення афінітет зв'язування становить приблизно 1пкМ, приблизно 2пкМ, приблизно 5пкМ, приблизно 10пкМ, приблизно 15пкМ, приблизно 20пкМ, приблизно 40пкМ або більш ніж приблизно 40пкМ. В одному варіанті здійснення афінітет зв'язування складає між приблизно 2нкМ і 22пкМ. В інших варіантах здійснення афінітет зв'язування складає менше за

приблизно 100нМ, приблизно 50нМ, приблизно 10нМ, приблизно 1нМ, приблизно 500пкМ, приблизно 100пкМ, приблизно 50пкМ, приблизно 10пкМ. У деяких варіантах здійснення афінітет зв'язування становить приблизно 10нМ. В інших варіантах здійснення афінітет зв'язування складає менше за приблизно 10нМ. В інших варіантах здійснення афінітет зв'язування становить приблизно 0,1нМ або приблизно 0,07нМ. В інших варіантах здійснення афінітет зв'язування складає менше за приблизно 0,1нМ або менше за приблизно 0,07нМ. В інших варіантах здійснення афінітет зв'язування складає будь-який з від приблизно 100нМ, приблизно 50нМ, приблизно 10нМ, приблизно 1нМ, приблизно 500пкМ, приблизно 100пкМ, приблизно 50пкМ до будь-якого з приблизно 2пкМ, приблизно 5пкМ, приблизно 10пкМ, приблизно 15пкМ, приблизно 20пкМ або приблизно 40пкМ. У деяких варіантах здійснення афінітет зв'язування складає будь-який з приблизно 100нМ, приблизно 50нМ, приблизно 10нМ, приблизно 1нМ, приблизно 500пкМ, приблизно 100пкМ або приблизно 50пкМ, або менше за приблизно 50пкМ. У ще одних варіантах здійснення афінітет зв'язування становить приблизно 2пкМ, приблизно 5пкМ, приблизно 10пкМ, приблизно 15пкМ, приблизно 20пкМ, приблизно 40пкМ або більше за приблизно 40пкМ.

Одним способом визначення афінітету зв'язування антитіл з NGF є вимірювання афінітету монофункціональних фрагментів Fab антитіла. Для отримання монофункціональних фрагментів Fab антитіло (наприклад, IgG) можна розщепити папаїном або експресувати рекомбінантно. Афінітет фрагмента Fab проти NGF антитіла можна визначити поверхневим резонансом плазмона (пристрій для визначення поверхневого резонансу плазмона (SPR) BIAcore 3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ). Чіпи CM5 можна активувати гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодіміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Людський NGF можна розвести в 10мМ ацетаті натрію при pH 4,0 і ін'єкувати зверху активованого чіпа в концентрації 0,005мг/мл. Використовуючи варіабельний час потоку по окремих каналах чіпа, можна досягнути два діапазони щільності антигену: 100-200 одиниць реакції (RU) для детальних кінетичних досліджень і 500-600 RU для скринінгових аналізів. Чіп можна блокувати етаноламіном. Дослідження регенерації показали, що суміш елюційного буфера Pierce (продукт №21004, Pierce Biotechnology IL) і 4М Nad (2:1) ефективно видаляє зв'язаний Fab, одночасно зберігаючи активність hNGF на чіпі протягом 200 ін'єкцій. Буфер HBS-EP (0,01М HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl, 3мМ EDTA, 0,005% поверхнево-активна речовина P20) використовують як робочий буфер для аналізів BIAcore. Серійне розведення (0,1-10× певний K<sub>D</sub>) зразків очищеного Fab ін'єкують протягом 1хв. в концентрації 100мкл/хв. і допускаються величини часу дисоціації до 2год. Концентрації білків Fab визначають ELISA і/або електрофорезом SDS-PAGE з використанням 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 1:1 [Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6:99-110] з використанням програми оцінки BIA. Величини константи рівноважної дисоціації ( $K_D$ ) можна розрахувати у вигляді  $k_{off}/k_{on}$ . Цей протокол підходить для використання при визначенні афінитету зв'язування антитіла з NGF будь-якого виду, включаючи людський NGF, NGF інших хребетних (в деяких варіантах здійснення, ссавців) (такий як мишачий NGF, щурячий NGF, NGF приматів), а також для використання з іншими нейротропінами, такими як споріднені нейротропіни NT3, NT4/5 і/або BDNF.

В деяких варіантах здійснення антитіло зв'язує людський NGF і значно не зв'язує NGF від інших видів хребетних (в деяких варіантах здійснення, ссавців). В деяких варіантах здійснення антитіло зв'язує людський NGF, а також один або декілька NGF від інших видів хребетних (в деяких варіантах здійснення, ссавців, таких як гризуни). У ще одних варіантах здійснення антитіло зв'язує NGF і не вступає в значну перехресну взаємодію з іншими нейротропінами (такими як споріднені нейротропіни NT3, NT4/5 і/або BDNF). В деяких варіантах здійснення антитіло зв'язує NGF, а також, щонайменше, один інший нейротропін. В деяких варіантах здійснення антитіло зв'язується з NGF видів ссавців, таких як кінь або собака, але значно не зв'язується з NGF від інших видів ссавців.

Епітопи можуть бути безперервними або переривистими. В одному варіанті здійснення 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 здійснення антитіло зв'язує по суті той самий епітоп hNGF, що і MAb 911. У ще одному варіанті здійснення антитіло зв'язує по суті той самий епітоп hNGF, що і MAb 909 [див. Hongo, et al., вище]. Наприклад, епітоп може включати один або декілька з: K32, K34 і E35 в межах варіабельної області 1 (амінокислоти 23-35) hNGF; залишки F79 і T81 в межах варіабельної області 4 (амінокислоти 81-88) hNGF; залишки H84 і K88 в межах варіабельної області 4; залишок R103 між варіабельною областю 5 (амінокислоти 94-98) hNGF і C-кінцем (амінокислоти 111-118) hNGF; залишок E11 в межах преваріабельної області 1 (амінокислоти 10-23) hNGF; Y52 між варіабельною областю 2 (амінокислоти 40-49) hNGF і варіабельною областю 3 (амінокислоти 59-66) hNGF; залишки L112 і S113 в межах C-кінця hNGF; залишки R59 і R69 в межах варіабельної області 3 hNGF; або залишки V18, V20 і G23 в межах преваріабельної області 1 hNGF. Крім того, епітоп може включати одну або декілька з варіабельної області 1, варіабельної області 3, варіабельної області 4, варіабельної області 5, N-кінцевої області і/або C-кінця hNGF. У ще одному варіанті здійснення антитіло значно знижує доступність для розчинника залишку R103 hNGF. Зрозуміло, що хоч описані вище епітопи відносяться до

людського NGF, середній фахівець в даній галузі може сумістити структури людського NGF з NGF інших видів і ідентифікувати вірогідні копії цих епітопів.

В одному аспекті антитіла (наприклад, людські, гуманізовані, мишачі, химерні), які можуть інгібувати NGF, можна отримати використанням імуногенів, які експресують повну довжину або часткову послідовність NGF. В іншому аспекті можна використовувати 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 узгоджуються з прийнятими і звичайними методиками для стимуляції і продукції антитіл, як далі описано в даному описі. Загальні методики для продукції людських і мишачих антитіл відомі в даній галузі і описані в даному описі.

Передбачається, що можна маніпулювати будь-яким ссавцем індивідумом, включаючи людей або отримані у них клітини, що продукують антитіла, для того, щоб служити як основа для продукції лінії клітин гібридами ссавців, включаючи людину. Звичайно тварина-хазяїн інокулюється внутрішньоочеревинно, внутрішньом'язово, перорально, підшкірно, внутрішньопідшовково і/або внутрішньошкірно деякою кількістю імуногену, включаючи те, як описано в даному описі.

Гібридами можна отримати з лімфоцитів і іморталізованих клітин мієломи з використанням загальної методики гібридизації соматичних клітин [Kohler, B. And Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497] або в модифікації [Buck, D.W., et al. *In Vitro*, 18:377-381 (1982)]. При гібридизації можна використовувати доступні лінії мієломи, включаючи, але не обмежуючись, X63-Ag8.653 і лінії з Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA. Загалом, методика включає злиття клітин мієломи і лімфоїдних клітин з використанням фузогену, такого як поліетилеогліколь, або електричними засобами, добре відомими фахівцям в даній галузі. Після злиття клітини відділяють від середовища злиття і вирощують у селективному ростовому середовищі, такому як середовище гіпоксантину-аміноптерину-тимідину (HAT), для видалення негібризованих батьківських клітин. Для культивування гібридом, які секретують моноклональні антитіла, можна використовувати будь-яке з описаних в даному описі середовищ з добавкою сироватки або без неї. Як іншу альтернативу методиці злиття клітин, можна використовувати В-клітини, іморталізовані EBV (вірусом Епштейна-Барра), для продукції моноклональних антитіл проти NGF даного винаходу. При бажанні, гібридами розповсюджуються і субклонуються, і надосадові рідини аналізують для виявлення антиімуногенної активності звичайними процедурами імуноаналізу (наприклад, радіоімуноаналізу, ферментного імуноаналізу або флюоресцентного імуноаналізу).

Гібридами, які можна використовувати як джерело антитіл, охоплюють всі похідні, клітини потомства батьківських гібридом, які продукують моноклональні антитіла, специфічні для NGF, або їх частини.

Гібридами, які продукують такі антитіла, можна вирощувати *in vitro* або *in vivo* з використанням відомих процедур. При бажанні, моноклональні антитіла можна виділити з культурального середовища або біологічних рідин звичайними процедурами очищення імуноглобуліну, такими як осадження сульфатом амонію, гель-електрофорез, діаліз, хроматографія і ультрафільтрація. Небажану активність у разі її присутності можна видалити, наприклад, проведенням отримання над адсорбентами, виготовленими з імуногену, прикріпленого до твердої фази, і елююванням 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, гемоціанін в формі замочної щілини або блюдця, сироватковий альбумін, бичачий тиреоглобулін або інгібітор трипсину соєвих бобів з використанням біфункціонального або дериватизуючого засобу, наприклад, складного малеїмідобензоїлового ефіру сульфосукциніміду (зв'язане зв'язування через цистеїнові залишки), N-гідроксисукциніміду (через лізинові залишки), глутаральдегіду, янтарного ангїтриду,  $\text{COCl}_2$  або  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , де R і  $\text{R}^1$  являють собою різні алкільні групи, може дати популяцію антитіл (наприклад, моноклональних антитіл).

При бажанні, антитіло проти NGF (моноклональне або поліклональне), яке цікавить, можна секвенувати, і полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид антитіла проти NGF, можна потім клонувати у вектор для експресії або поширення. Послідовність, що кодує антитіло, яке представляє інтерес, може підтримувати у векторі в клітині-хазяїні, і клітини-хазяїни можна потім розмножувати і заморозити для майбутнього застосування. В альтернативі, полінуклеотидну послідовність можна використати для генетичного маніпулювання для «гуманізації» антитіла або для поліпшення афінитету або інших характеристик антитіла. Наприклад, константну область можна піддати маніпуляціям генної інженерії для того, щоб вона більше нагадувала людські константні області для уникнення імунної реакції, якщо антитіло використовується в клінічних випробуваннях і способах лікування у людей. Може бути бажано піддати генетичним маніпуляціям послідовність антитіла для отримання більшого афінитету до NGF і більше ефективності при інгібуванні NGF. Для фахівця в даній галузі буде очевидно, що можна зробити одне або декілька змін полінуклеотиду в антитілі проти NGF і все ж зберегти його здатність зв'язуватися з NGF.

Існує 4 загальні стадії для гуманізації моноклонального антитіла. Вони являють собою: (1) визначення нуклеотиду і прогнозованої амінокислотної послідовності легкого і важкого

варіабельних доменів вихідного антитіла, (2) проектування гуманізованого антитіла, тобто рішення, яку каркасну область антитіла використати під час процесу гуманізації; і (4) трансфекція і експресія гуманізованого антитіла [див., наприклад, патенти США №№ 4816567, 5807715, 5866692, 6331415, 5530101, 5693761, 5693762, 5585089 і 6180370]. Був описаний ряд молекул «гуманізованого» антитіла, що включають зв'язувальний антигенний сайт, отриманий з надлюдського імуноглобуліну, включаючи химерні антитіла, що мають області V гризунів або модифіковані області V гризунів і їх асоційовані області (CDR), що визначають комплементарність, злиті з людськими константними 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)]. Інші посилання описують CDR гризунів, пересаджений в людську опорну каркасну область (FR) перед злиттям з константним доменом відповідного 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)]. Інше посилання описує CDR гризунів, підтримувані рекомбінантно облицьовані каркасні області гризунів [див., наприклад, європейську патентну публікацію №519596]. Ці «гуманізовані» молекули призначені для мінімізації небажаної імунологічної реакції відносно молекул антилюдських антитіл гризунів, яка обмежує тривалість і ефективність терапевтичних видів застосування цих частин у людей-реципієнтів. Наприклад, константну область антитіла можна сконструювати методами генної інженерії так, що вона буде імунологічно інертною (наприклад, не запускає лізис комплементом [див., наприклад, PCT/GB99/01441; заявка на патент Великобританії № 9809951.8]). Інші способи гуманізації антитіл, які можна також використати, розкриті [Daugherty et al., *Nucl. Acids. Res.* 19:2471-2476 (1991) і в патентах США №№ 6180377, 6054297, 5997867, 5866692, 6210671, 6350861, і в публікації PCT №01/27160. Інші способи описані в заявці на патент США під серійним №10/745775].

У ще одній альтернативі повністю людські антитіла можна отримати використанням мишей, що є в продажу, які були піддані модифікації генною інженерією для експресії специфічних білків людського імуноглобуліну. Трансгенні тварини, які призначені для продукції більш бажаних (наприклад, повністю людських антитіл) або більш доцільної імунної відповіді, можна також використовувати для генерування гуманізованих або людських антитіл. Прикладами такої технології є *Xenomouse*<sup>™</sup> від Abgenix, Inc. (Fremont, CA) і *HuMAb-Mouse* і *TC Mouse*<sup>™</sup> від Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

Очевидно, що хоч наведене вище обговорення відноситься до гуманізованих антитіл, загальні обговорені принципи застосовні для отримання антитіл для використання, наприклад, у собак, кішок, приматів, коней і корів. Крім того,

очевидно, що один або декілька описаних в даному описі аспектів гуманізації антитіл можуть комбінуватися, наприклад, пересадка CDR, мутація каркаса і мутація CDR.

В альтернативі, антитіла можна отримати рекомбінантно і експресувати з використанням будь-якого способу, відомого в даній галузі. В іншій альтернативі, антитіла можна виготовити рекомбінантно технологією відтворення фага [див., наприклад, патенти США №№ 5565332, 5580717, 5733743, 6265150 і Winteer et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994)]. Альтернативно, можна використати технологію відтворення фага [McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990)] для продукції людських антитіл і фрагментів антитіл *in vitro* з генних репертуарів варіабельного (V) домену імуноглобуліну від імунізованих донорів. Відповідно до цієї методики, гени домену V антитіла клонуються всередину рамки або в ген або великого, або маленького білка покриття ниткоподібного бактеріофага, такого як M13 або fd, і виявляються у вигляді функціональних фрагментів антитіла на поверхні частинки фага. У зв'язку з тим, що ниткоподібна частинка містить копію однострункової ДНК генома фага, селекції, засновані на функціональних властивостях антитіла, також приводять до відбору гена, що кодує антитіло, що проявляє ці властивості. Таким чином, фаг імітує деякі з властивостей В-клітини. Відтворення фага можна виконати в різних форматах [огляд [див., наприклад, в публікації Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993)]. Декілька джерел сегментів V гена можна використати для відтворення фага. [Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)] виділили різноманітний ряд антитіл проти оксазолону з маленької, випадкової комбінаторної бібліотеки генів V, отриманої з селезінок імунізованих мишей. Можна сконструювати репертуар генів V від імунізованих людей-донорів, і антитіла до різноманітного ряду антигенів (включаючи аутоантигени) можна виділити, по суті слідуючи методикам, описаним [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 антитіла нагромаджують мутації з високою швидкістю (соматична гіпермутація). Деякі з введених змін додадуть більш високий афінітет, і В-клітини, що виявляють високо афінний поверхневий імуноглобулін, переважно реплікуються і диференціюються під час введення подальшої дозволяючої дози антигену. Цей природний процес можна імітувати використанням методики, відомої як «перетасовування ланцюга» [Marks, et al., *Bio/Technol.* 10:779-783 (1992)]. В цьому способі афінітет «первинних» людських антитіл, отриманих відтворенням фага, можна поліпшити послідовним заміщенням генів області V важкого і легкого ланцюга репертуарами варіантів (репертуарів) генів домену, що природно зустрічаються V, отриманих у неімунізованих донорів. Ця методика забезпечує можливість продукції антитіл і фрагментів антитіл з афінітетами в діапазоні пкМ-нМ. Стратегія виготовлення дуже великих репертуарів антитіл

фага (також відомих, як «джерело всіх бібліотек») була описана [Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266 (1993)]. Перетасовування гена можна також використати для отримання людських антитіл з антитіл гризунів, де людське антитіло має афінітети і специфічність, аналогічні вихідному антитілу гризунів. Відповідно до цього способу, який також іменується «вдрукуванням епітопу», ген домену V важкого або легкого ланцюга антитіл гризунів, отриманих методикою відтворення фага, замінюється репертуаром генів людського домену V, створюючи химери гризуна-людини. Відбір на антигені приводить до виділення людських, варіабельних областей, здатних відновити сайт, який зв'язує функціональний антиген, тобто епітоп управляє (вдруковує) вибором партнера. Коли процес повторюється для заміщення домену V гризунів, що залишається, виходить людське антитіло [див. патентну заяву PCT WO 9306213, опубліковану 1 квітня 1993р.]. На відміну від традиційної гуманізації антитіл гризунів, які не мають каркаса або залишки CDR, що походять від гризунів. Очевидно, що хоч приведенне вище обговорення відноситься до гуманізованих антитіл, загальні обговорені принципи застосовні до отримання на вимогу антитіл для використання, наприклад, у собак, кішок, приматів, коней і корів.

Антитіла можна виготовити рекомбінантно спочатку виділенням антитіл і клітин, що продукують антитіла, від тварин-хазяїнів, отримуючи генну послідовність, і використовуючи генну послідовність для рекомбінантної експресії антитіла в клітинах-хазяїнах (наприклад, клітинах CHO). Інший спосіб, який можна використати, являє собою експресію послідовності антитіл у рослин (наприклад, тютюну) або трансгенного молока. Були розкриті способи рекомбінантної експресії антитіл у рослин або молока [див., наприклад, Peeters, et al. *Vaccine* 19:2756 (2001); Lonberg, N. and D. Huszar *IntRev.Immunol* 13:65 (1995); і Pollock, et al, *J Immunol Methods* 231:147 (1999)]. Способи отримання похідних антитіл, наприклад, гуманізованих, одноланцюгових і т.д., відомі в даній галузі.

Імунні аналізи і методики сортування проточною цитометрією, такі як сортування клітин, активоване флюоресценцією (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, природна і модифікована целюлоза, поліакриламід, агарози і магнетит. Природа носія може бути або розчинною, або нерозчинною для цілей винаходу. Фахівцям в даній галузі відомі інші відповідні носії для зв'язування антитіл або способи встановити їх з використанням звичайного експериментування.

ДНК, що кодує моноклональні антитіла, легко ізолюється і секвенується з використанням звичайних процедур (наприклад, використанням олігонуклеотидних зондів, які здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкий і легкий



ланцюги моноклональних антитіл). Клітини гібридами служать як переважне джерело такої ДНК. Після ізоляції ДНК можна вмістити у вектори експресії, які потім трансфікуються в клітини-хазяїни, такі як клітини *E.coli*, мавпячі клітини COS, клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO) або клітини міеломи, які інакше не продукують білок імуноглобуліну для отримання синтезу моноклональних антитіл в рекомбінантних клітинах-хазяїнах. ДНК може також бути модифікованою, наприклад, заміщенням кодувочої послідовності на константні домени 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 всю або частину кодувочої послідовності, на неімуноглобуліновому поліпептиді. Таким чином, виходять «химерні» або «гібридні» антитіла, які мають специфічність зв'язування описаного в даному описі моноклонального антитіла проти NGF. ДНК, що кодує антагоністичне антитіло проти NGF (таке як гуманізоване антагоністичне антитіло проти людського NGF), можна використати для доставки і експресії антагоністичного антитіла проти людського NGF бажаною клітиною, як описано в даному описі. Методики доставки ДНК далі описані в даному описі.

Антитіла проти NGF можна характеризувати з використанням способів, добре відомих в даній галузі. Наприклад, один спосіб являє собою ідентифікацію епітопу, з яким воно зв'язується, званий «картування епітопу». Існує багато способів, відомих в даній галузі, для картування і характеристики локалізації епітопів на білках, включаючи розчинення структури кристала комплексу антитіло-антиген, конкурентні аналізи, аналізи експресії генних фрагментів і аналізи на основі синтетичних пептидів, як описано, наприклад, в [11 розділі Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999]. У додатковому прикладі картування епітопу можна використовувати для визначення послідовності, з якою зв'язується антитіло проти NGF. Картування епітопу є в продажу з багатьох джерел, наприклад, [Pepscan Systems (Edelthertweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands)]. Епітоп може являти собою лінійний епітоп, тобто що міститься в одному фрагменті секвенування амінокислот, або конформаційний епітоп, утворений тримірною взаємодією амінокислот, які необов'язково можуть міститися в одному фрагменті секвенування. Пептиди різної довжини (наприклад, щонайменше, довжиною 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'язування антитілом проти NGF. Відповідно до аналізів експреси генних фрагментів, відкрита рамка читування, що кодує NGF, фрагментована або

випадково, або специфічними генетичними конструкціями, і визначається реактивність експресованих фрагментів NGF з антитілом, що підлягає тестуванню. Генні фрагменти можуть, наприклад, продукуватися PCR (полімеразною реакцією синтезу ланцюга), а потім транскрибуватися і транслюватися в білок *in vitro* в присутності радіоактивних амінокислот. Потім визначається зв'язування антитіла з радіоактивно міченими фрагментами NGF імунопреципітацією і гель-електрофорезом. Певні епітопи можна також ідентифікувати використанням великих бібліотек випадкових пептидних послідовностей, що виявляються на поверхні частинок фага (бібліотек фатів). Альтернативно, певну бібліотеку перекриваючих фрагментів пептидів можна тестувати на зв'язування з випробовуваним антитілом в простих аналізах зв'язування. У додатковому прикладі мутагенез домену, що зв'язує антиген, експерименти обміну доменів і скануючий мутагенез 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 (обмінені) послідовностями з близько спорідненого, але антигенно відмінного, білка (такого як інший член сімейства білків нейротропінів). Оцінкою зв'язування антитіла з мутантним NGF можна оцінити значення певного 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 й інші антитіла. Конкурентні аналізи добре відомі фахівцям в даній галузі. Приклади антитіл, які можна використовувати 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 використовувати антагоністи NGF, відмінні від антитіл проти NGF. У деяких варіантах здійснення винаходу антагоніст NGF включає, щонайменше, одну антисмислову молекулу, здатну блокувати або зменшувати експресію функціонального NGF, або функціонального рецептора *trkA* і/або *p75*. Нуклеотидні послідовності NGF, *trkA* і *p75* відомі і легко доступні із загальнодоступних 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)]. Загальновідоме отримання молекул антисмислового олігонуклеотиду, які специфічно зв'язують мРНК NGF, *trkA* або *p75* без перехресної взаємодії з іншими полінуклеотидами. Ілюстративні сайти наділення включають, але не обмежуються, кодон ініціації, регуляторні області 5', кодувочу послідовність і нетрансльовану область 3'. В деяких варіантах здійснення

олігонуклеотиди мають довжину приблизно від 10 до 100 нуклеотидів, мають довжину приблизно від 15 до 50 нуклеотидів, мають довжину приблизно від 18 до 25 нуклеотидів, або більше. Олігонуклеотиди можуть включати модифікації каркаса, такі як, наприклад, фосфортіоатні зв'язки, і модифікації 2'-О цукрів, добре відомі в даній галузі [див., наприклад, Agrawal and Zhao (1998), *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 8, 135-139]. Ілюстративні антисмислові молекули включають антисмислові молекули NGF, описані в [патентній публікації США №20010046959; див. також <http://www,rna-tec.com/repair.htm>].

Альтернативно, експресію і/або вивільнення NGF можна зменшити з використанням «оглушення» гена, морфоліно олігонуклеотидів, IPHK або рибосом, способів, які добре відомі в даній галузі. [Див., наприклад, Rossi, JJ. et al., eds., "Intracellular Ribozyme Applications: Principles and Protocols, "Horizon Scientific Press (Duarte, CA, 1999); US 6506559; WO 02/244321; WO 01/192513; WO 01/29058].

В інших варіантах здійснення антагоніст NGF включає, щонайменше, одну сполуку, що інгібує NGF. Використовуваний в даному описі термін «сполука, що інгібує NGF», відноситься до сполуки, відмінної від антитіла проти NGF, яка прямо або непрямо знижує, інгібує, нейтралізує або усуває біологічну активність NGF. Сполука, що інгібує NGF, повинна проявляти будь-яку одну або декілька з наступних характеристик: (а) зв'язування з NGF і інгібування біологічної активності і/або низхідного шляху (шляхів), опосередкованого функцією передачі сигналів NGF; (b) лікування або профілактика будь-якого аспекту болю, зокрема, в поєднанні з НСП33; (c) блокування або зменшення активації рецепторів NGF (включаючи димеризацію і/або аутофосфорилування рецепторів trkA); (d) збільшення виведення NGF; (e) інгібування (зниження) синтезу, продукції або вивільнення NGF; (f) посилення лікування болю НСП33. Ілюстративні сполуки, що інгібують NGF, включають дрібномолекулярні інгібітори NGF, описані в [патентній публікації США №20010046959]; сполуки, які інгібують зв'язування NGF з p75, як описано в [публікації PCT №WO 00/69829]; сполуки, які інгібують зв'язування NGF з TrkA/p75, як описано в [публікації PCT №WO 98/17278]. Додаткові приклади сполук, що інгібують NGF, включають сполуки, описані в [публікаціях PCT №№ WO 02/17914, WO 02/20479, в патентах США №№ 5342942, 6127401 і 6359130]. Інші ілюстративні сполуки, що інгібують NGF, являють собою сполуки, які є конкурентними інгібіторами NGF [див. патент США №6291247]. Крім того, фахівець в даній галузі може отримати інші дрібномолекулярні сполуки, що інгібують NGF.

В деяких варіантах здійснення сполука, що інгібує NGF, зв'язує NGF. Ілюстративні сайти наділення (зв'язування) включають, але не обмежуються, частину NGF, яка зв'язується з рецептором TrkA і/або рецептором p75, і ті частини NGF, які прилягають до області, що зв'язує рецептори, і які частково відповідальні за правильну тримірну форму частини, що зв'язує

рецептори. В іншому варіанті здійснення сполука, що інгібує NGF, зв'язується з рецепторами NGF (такими як TrkA і/або p75) і інгібує біологічну активність NGF. Ілюстративні сайти наділення включають ті частини TrkA і/або p75, які зв'язуються з NGF.

У варіанті здійснення, що включає маленьку молекулу, маленька молекула може мати молекулярну масу приблизно будь-якої величини 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 використанням будь-яких засобів, відомих в даній галузі, включаючи інгаляцію, введення внутрішньоочеревинно, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно, підоболонково, в шлуночки головного мозку, перорально, ентерально, парентерально, інтраназально або дермально. У деяких варіантах здійснення, коли антагоніст NGF являє собою маленьку молекулу, він вводиться в кількості від 0,1 до 300 мг/кг маси пацієнта, розділених на 1-3 або більше доз. Для дорослого пацієнта з нормальною масою тіла можна вводити дози в діапазоні від 1 мг до 5 г на 1 дозу.

В інших варіантах здійснення антагоніст NGF включає, щонайменше, один структурний аналог NGF. «Структурні аналоги NGF» в даному винаході відносяться до сполук, які мають однакову тримірну структуру у вигляді частини структури NGF і які зв'язуються з рецептором NGF в фізіологічних умовах *in vitro* або *in vivo*. В одному варіанті здійснення 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 №6291246]; циклічні сполуки, описані в [патенті США №6017878], і пептиди, отримані з NGF, описані в [публікації PCT №WO89/09225]. Відповідні структурні аналоги NGF можуть також конструюватися і синтезуватися за допомогою молекулярного моделювання зв'язування рецепторів NGF, наприклад, способом, описаним в [публікації PCT №WO 98/06048]. Структурні аналоги NGF можуть являти собою мономери або димери/олігомери в будь-якій бажаній комбінації їх або інших структур для отримання поліпшених афінітетів і біологічних ефектів.

В інших варіантах здійснення винахід надає антагоніст NGF, що включає, щонайменше, один домінантно-негативний мутант рецептора TrkA і/або рецептора p75. Фахівець в даній галузі може отримати домінантно-негативні мутанти, наприклад, рецептора TrkA, так що рецептор буде зв'язувати NGF, і, таким чином, діяти як «злив» для захоплення NGF. Однак домінантно-негативні мутанти не будуть мати нормальної біологічної активності 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 в білковій формі або в формі вектора експресії, так що доміантно-негативний мутант (наприклад, мутантний рецептор TrkA) експресований *in vivo*. Білок або вектор експресії можна вводити з використанням будь-якого засобу, відомого в даній галузі, такого як введення внутрішньоочеревинно, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно, підболонокво, в шлуночки головного мозку, перорально, ентерально, парентерально, інтраназально, дермально або шляхом інгаляції. Наприклад, введення вектора експресії включає локальне або системне введення, включаючи ін'єкцію, пероральне введення, введення у вигляді частинок з використанням ін'єкційного пістолета або катетера і місцеve введення. В інших варіантах здійснення білок або вектор експресії вводиться прямо в симпатичний або сенсорний стовбур або ганглії. Фахівець в даній галузі знайомий з введенням векторів експресії для отримання експресії екзогенного білка *in vivo* [див., наприклад, патенти США №№ 6436908; 6413942; 6376471].

Можна також використовувати націлену доставку терапевтичних композицій, що містять антисмисловий полінуклеотид, вектор експресії або субгеномні полінуклеотиди. Опосередковані рецепторами методи доставки ДНК описані, наприклад, в [публікаціях Findeis et al, Trends Biotechnol (1993) 11:202; Chiou et al. Celi 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, вводяться в діапазоні від приблизно 100нг до приблизно 200мг (або більше) ДНК для локального введення в протоколі генної терапії. У деяких варіантах здійснення в ході протоколу генної терапії можна також використати діапазони концентрації менше за приблизно 500нг, від приблизно 500нг до приблизно 50нг, від приблизно 1мг до приблизно 2мг, від приблизно 5мг до приблизно 500мг і від приблизно 20мг до приблизно 100мг або більше за ДНК. Терапевтичні полінуклеотиди і поліпептиди даного винаходу можна доставити з використанням носіїв генної доставки. Носії генної доставки можуть бути вірусного або невірусного 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 ссавців або гетерологічних промоторів і/або підсилювачів. Експресія кодуючої послідовності може бути або конститутивною, або регульованою.

Вектори на вірусній основі для доставки бажаного полінуклеотиду і експресії в бажаній клітині добре відомі в даній галузі. Ілюстративні вектори на вірусній основі 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 Іспанії №0345242], вектори на основі альфа-вірусу (наприклад, вектори на основі вірусу Синдбіс, вірусу лісу Семліки (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), вірусу ріки Роце (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) і вірусу венесуельського кінського енцефаліту (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532), і адено-асоційованого вірусу (AAV) [див., наприклад, публікації PCT №№ WO 04/12649, 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 невірусні носії доставки, включаючи, але не обмежуючись, полікатіонну, конденсовану ДНК, сполучену з одним убитим аденовірусом [див., наприклад, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147]; ДНК, сполучену 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 нуклеїнового заряду або злиття з клітинними мембранами. Можна також використати депротейнізовану ДНК. Ілюстративні способи введення депротейнізованої ДНК описані в [публікації PCT № WO 90/11092 і в патенті США № 5580859]. Ліпосоми, які можуть діяти як носії генної доставки, описані в [патенті США № 5422120; публікаціях PCT №№ WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445 і патенті Іспанії №0524968]. Додаткові підходи описані в [публікації Philip, Mol. Cell. Biol. (1994) 14:2411° і в публікації Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581].

Також очевидно, що вектор експресії можна використати для напрямку експресії будь-якого з антагоністів NGF на основі білка, описаних в даному описі (наприклад, антитіло проти NGF, імуоадгезин TrkA і т.д.). Наприклад, полінуклеотид, що кодує антагоністичне антитіло проти NGF, можна також використовувати для доставки і експресії антагоністичного антитіла проти NGF в бажаній клітині. Очевидно, що вектор експресії можна використовувати для напрямку експресії антагоністичного антитіла проти NGF. Вектор експресії можна вводити внутрішньоочеревинно, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно, підболонокво, в шлуночки головного мозку, перорально, ентерально, парентерально, інтраназально, дермально або шляхом інгаляції. Наприклад, введення векторів експресії включає локальне або системне введення і місцеve введення. Як далі обговорюється в даному описі, фахівець в даній галузі знайомий з введенням векторів експресії

для отримання експресії екзогенного білка *in vivo* [див., наприклад, патенти США №№ 6436908; 6413942 і 6376471]. У даній області відомі інші фрагменти рецептора TrkA, які здатні блокувати NGF (від часткової до повної блокади) і/або біологічну активність NGF.

В іншому варіанті здійснення антагоніст NGF включає, щонайменше, один імуноадгезин TrkA. Використовувані в даному описі імуноадгезини TrkA відносяться до розчинних химерних молекул, що включають позаклітинний домен рецептора TrkA (або його частину), і послідовності імуноглобуліну, яка зберігає специфічність зв'язування (в деяких варіантах здійснення, по суті зберігає специфічність зв'язування) рецептора TrkA і здатна зв'язуватися з NGF. Імуноадгезин TrkA здатний блокувати (знижити і/або подавити) біологічну активність NGF, як описано в даному описі.

Імуноадгезини TrkA відомі в даній галузі, і було виявлено, що вони блокують (знижують або пригнічують) зв'язування NGF з рецептором TrkA [див., наприклад, патент США №6153189]. В одному варіанті здійснення імуноадгезин TrkA включає злиття амінокислотної послідовності рецептора TrkA, здатної зв'язувати NGF (або амінокислотну послідовність, яка по суті зберігає специфічність зв'язування рецептора TrkA) і послідовність імуноглобуліну (або амінокислоту, яка по суті зберігає специфічність зв'язування рецептора TrkA). У деяких варіантах здійснення рецептор TrkA являє собою послідовність людського рецептора TrkA, і злиття відбувається з послідовністю константного домену імуноглобуліну. В інших варіантах здійснення послідовність константного домену імуноглобуліну являє собою послідовність константного домену важкого ланцюга імуноглобуліну. В інших варіантах здійснення асоціація двох злиттів рецептора TrkA важкого ланцюга імуноглобуліну (наприклад, через ковалентний сполучення дисульфід ним зв'язком (зв'язками)) приводить до структури, подібної гомодимерному імуноглобуліну. Легкий ланцюг імуноглобуліну може, крім того, бути асоційований з однією або обома химерами імуноглобуліну рецептора TrkA в зв'язаний дисульфідом димер для отримання гомотримерної або гомотетрамерної структури. Приклади відповідних імуноадгезинів TrkA включають імуноадгезини, описані в [патенті США №6153189].

В іншому варіанті здійснення антагоніст NGF включає, щонайменше, одне антитіло проти TrkA, здатне блокувати, пригнічувати, змінювати і/або знижувати 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 РСТ №№ WO 97/21732, WO 00/73344, WO 02/15924 і патентній публікації США №20010046959]. В іншому варіанті здійснення антагоніст NGF включає, щонайменше, одне антитіло проти p75, здатне блокувати, пригнічувати і/або знижувати фізичну взаємодію

NGF з рецептором p75 і/або низхідну передачу сигналів, за допомогою чого біологічна активність NGF знижується і/або блокується.

В іншому варіанті здійснення антагоніст NGF включає, щонайменше, один інгібітор кінази, здатний інгібувати низхідну передачу сигналів кінази, пов'язаних з активністю рецепторів TrkA і/або p75. Ілюстративні інгібітори кінази являють собою K252a або K252b, які відомі в даній галузі і описані 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. резюме і 12th Collective Chemical Substance Index, p.34237, з 3 (5-7), 55-60, 66-69, p.34238, с.1 (41-44), с.2 (25-27, 32-33), p.3423, с.3 (48-50, 52-53); патент США №6306849].

Очікується, що клініцист при пошуку зможе ідентифікувати ряд інших категорій антагоністів NGF.

#### Ідентифікація антагоністів NGF

Антитіла проти NGF та інші антагоністи NGF можна ідентифікувати або охарактеризувати з використанням способів, відомих в даній галузі, за допомогою чого виявляється і/або вимірюється зниження, полегшення або нейтралізація біологічної активності NGF. Наприклад, аналіз активації рецепторів кінази (KIRA), описаний в [патентах США №№ 5766863 і 5891650], можна використовувати для ідентифікації засобів проти NGF. Цей аналіз типу ELISA підходить для якісного або кількісного вимірювання активації кінази вимірюванням аутофосфорилування домену кінази тирозинкінази білка рецептора (що далі іменується "rPTK"), наприклад, рецептора TrkA, а також для ідентифікації і характеристики потенційних антагоністів вибраного rPTK, наприклад, TrkA. Перша стадія аналізу включає фосфорилування домену кінази рецептора кінази, наприклад, рецептора TrkA, причому рецептор присутній в клітинній мембрані еукаріотичної клітини. Рецептор може являти собою ендогенний рецептор або нуклеїнову кислоту, що кодує рецептор, або конструктор рецептора може бути трансформований в клітину. Звичайно перша тверда фаза (наприклад, ямка першої аналітичної планшети) покривається по суті однорідною популяцією таких клітин (звичайно лінії клітин ссавців) так, що клітини прилипають до твердої фази. Часто клітини є прикріпленими до субстрату, і, за допомогою цього, вони природно прикріплюються до першої твердої фази. Якщо використовується «конструктор рецептора», він звичайно включає злиття рецептора кінази і сигнальний поліпептид. Сигнальний поліпептид розпізнається засобом захоплення, часто антитілом захоплення, в частині ELISA аналізу. Речовина, що аналізується, така як перспективне антитіло проти NGF або інший антагоніст NGF, потім додається разом з NGF в ямку, що має прикріплені клітини, так що рецептор тирозинкінази (наприклад, рецептор TrkA) зазнає впливу (або контактує) з NGF і речовиною, що аналізується. Цей аналіз забезпечує можливість ідентифікації антитіл (або іншого антагоніста NGF), які інгібують активацію TrkA його лігандом

NGF. Після контакту з NGF і речовиною, що аналізується, прикріплені клітини солюбілізуються з використанням буфера лізису (який містить в собі солюбілізуючий детергент) і обережного перемішування, вивільняючи за допомогою цього клітинний лізат, який може бути підданий безпосередньо частині ELISA аналізу без необхідності концентрації або освітлення клітинного лізату.

Отриманий таким чином клітинний лізат потім готовий бути підданий стадії ELISA аналізу. Як перший етап стадії ELISA, другу тверду фазу (звичайно ямку титрувальної планшети ELISA) покривають засобом захоплення (часто антитілом захоплення), який специфічно зв'язується з рецептором тирозинкінази або, у разі конструкта рецептора, з сигнальним поліпептидом. Покриття другої твердої фази проводиться так, що засіб захоплення прикріплюється до другої твердої фази. Засіб захоплення являє собою в цілому моноклональне антитіло, але, як описано в прикладах в даному описі, можуть також використовуватися поліклональні антитіла. Отриманий клітинний лізат потім зазнає впливу або контактує з прикріплювальним засобом захоплення так, що рецептор або конструкт рецептора прикріплюється до (або захоплюється у) другу тверду фазу. Потім проводиться етап промивання з тим, щоб видалити незв'язаний клітинний лізат, залишаючи захоплений рецептор або конструкт рецептора. Прикріплений або захоплений рецептор або конструкт рецептора потім зазнає впливу або контактує з антитілом проти фосфотирозину, яке ідентифікує фосфорильовані залишки тирозину в рецепторі тирозинкінази. В одному варіанті здійснення антитіло проти фосфотирозину зв'язано пов'язане (прямо або непрямо) з ферментом, який каталізує зміну кольору нерадіоактивного колірною реактиву. Відповідно, фосфорильовання рецептора можна виміряти подальшою зміною кольору реагенту. Фермент може бути безпосередньо зв'язаний з антитілом проти фосфотирозину, або кон'югуюча молекула (наприклад, біотин) може бути кон'югована з антитілом проти фосфотирозину, і фермент може бути в подальшому зв'язаний з антитілом проти фосфотирозину за допомогою кон'югуючої молекули. Нарешті, вимірюють зв'язування антитіла проти фосфотирозину із захопленням рецептором або конструктом рецептора, наприклад, зміною кольору у кольорового реагенту.

Антагоністи NGF можна також ідентифікувати інкубацією перспективного засобу з NGF і моніторингом будь-якої однієї або декількох з наступних характеристик: (а) зв'язування з NGF і інгібування біологічної активності NGF і/або низхідного шляху (шляхів), опосередкованого функцією передачі сигналів NGF; (b) блокування або зменшення активації рецепторів NGF; (c) збільшення виведення NGF; (d) інгібування активації рецепторів NGF (включаючи димеризацію і/або аутофосфорилування TrkA); (e) лікування, полегшення або профілактика будь-якого аспекту болю, зокрема, в поєднанні з НСПЗЗ; (f) 50 інгібування (зниження) синтезу,

продукції або вивільнення NGF; (g) посилення лікування болю НСПЗЗ. У деяких варіантах здійснення антагоніст NGF ідентифікується інкубацією перспективного засобу з NGF і моніторингом зв'язування і супутнього зменшення або нейтралізації біологічної активності NGF. Аналіз зв'язування можна виконати очищеним поліпептидом (поліпептидами) NGF або клітинами, які природно експресують або трансфіковані для експресії поліпептиду (поліпептидів) NGF. В одному варіанті здійснення аналіз зв'язування являє собою аналіз конкурентного зв'язування, де оцінюється здатність перспективного антитіла конкурувати з відомим антагоністом NGF за зв'язування NGF. Аналіз можна виконувати в різних форматах, включаючи формат ELISA. В інших варіантах здійснення антагоніст NGF ідентифікується інкубацією перспективного засобу з NGF і моніторингом супутнього інгібування димеризації і/або аутофосфорилування рецептора TrkA.

Після первинної ідентифікації активність перспективного антагоніста проти NGF можна далі підтвердити і уточнити біологічними аналізами, які, як відомо, тестують націлені види біологічної активності. Альтернативно, біологічні аналізи можна використати для прямого скринінгу кандидатів. Наприклад, NGF сприяє ряду морфологічно розпізнаваних змін в клітинах, що реагують. Вони включають, але не обмежуються, сприяння диференціюванню 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. And Angeletti, P. *Nerve growth factor. Physiol. Rev.* 48, 534-569, 1968] і сприяння виживанню нейронів, залежних від NGF, таких як нейрони ембріонального дорсального кореневого ганглію, трійчастого ганглію або симпатичного ганглію [наприклад, Chun & Patterson, *Dev. Biol.* 75:705-711, (1977); Buchman & Davies, *Development* 118:989-1001, (1993)]. Таким чином, аналіз на інгібування біологічної активності NGF тягне за собою культивування клітин, що реагують на NGF, з NGF плюс речовина, що аналізується, така як перспективне антитіло проти NGF і перспективний антагоніст NGF. Після відповідного часу треба аналізувати реакцію клітин (диференціювання клітин, розростання нейритів або виживання клітин).

Визначення здатності антагоніста перспективного NGF блокувати або нейтралізувати біологічну активність NGF можна також провести моніторингом здатності перспективного засобу інгібувати опосередковане NGF виживання в біологічному аналізі виживання ембріональних щурячих дорсальних корневих гангліїв, як описано в [публікації Kongo, et al., *Hybridoma* 19:215-227 (2000)]. Спосіб ідентифікації модуляторів активності NGF описаний в [PCT/US2004/01609].

Композиції

Композиції винаходу включають ефективну кількість антагоніста NGF (такого як антитіло проти

NGF) і НСПЗЗ, як описано в різних варіантах здійснення, описаних в даному описі. У деяких варіантах здійснення композиції, крім того, містять фармацевтично прийнятний ексципієнт. У деяких варіантах здійснення композиція призначена для застосування в будь-якому з способів, описаних в даному описі (таких як способи лікування післяопераційного болю). Приклади таких композицій, а також те, як їх складати, також описані в попередньому розділі і нижче. Антагоніст NGF і НСПЗЗ можуть бути присутніми в одній композиції або бути присутніми у вигляді окремих композицій. Відповідно, в деяких варіантах здійснення антагоніст NGF і НСПЗЗ присутні в одній і тій самій композиції. В інших варіантах здійснення антагоніст NGF і НСПЗЗ присутні в окремих композиціях.

В іншому аспекті винахід надає синергічну композицію антагоніста NGF і НСПЗЗ.

У деяких варіантах здійснення винахід надає фармацевтичні композиції, що включають антагоніст NGF, для застосування при лікуванні болю (такого як післяопераційний біль), причому вказане застосування включає одночасне і/або послідовне введення НСПЗЗ. У деяких варіантах здійснення винахід надає фармацевтичні композиції, що включають НСПЗЗ для лікування болю, причому вказане застосування включає одночасне і/або послідовне введення антагоніста NGF. У деяких варіантах здійснення винахід надає фармацевтичні композиції, що включають антагоніст NGF і НСПЗЗ для окремого, одночасного і/або послідовного застосування для лікування болю. У деяких варіантах здійснення антагоніст NGF являє собою антитіло проти NGF (таке як антитіло ЕЗ, як описано в даному описі). В інших варіантах здійснення НСПЗЗ являє собою ібупрофен. У ще одних варіантах здійснення антагоніст NGF являє собою антитіло проти NGF, і НСПЗЗ являє собою ібупрофен.

Зрозуміло, що композиція може включати більше одного антагоніста NGF. Наприклад, композиція може включати більше одного члена класу антагоністів NGF (наприклад, суміш антитіл проти NGF, які розпізнають різні епітопи NGF), а також члени різних класів антагоністів NGF (наприклад, антитіла проти NGF і сполуки, що інгібує NGF). Інші ілюстративні композиції включають більше одного антитіла 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. В інших варіантах здійснення композиція включає один або декілька антагоністів NGF, вибраних з групи, що складається з антагоніста, який зв'язує (фізично взаємодіє з) NGF (наприклад, антитіло), антагоніст, який зв'язується з рецептором NGF (таким як рецептор TrkA або рецептор p75), і антагоніст, який знижує (гальмує і/або блокує) низхідну передачу сигналів рецептора NGF.

Композиція, що застосовується в даному винаході, може, крім того, включати фармацевтично прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори [Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and

Wilkins, Ed. K. E. Hoover], в формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів у використовуваних дозуваннях і концентраціях і можуть включати буфери, такі як фосфат, цитрат і інші органічні кислоти; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію, хлорид бензетонію; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил або пропілпарабен; катехол; резорцінол; циклогексанол; 3-пентанол і м-крезол); поліпептиди низької молекулярної маси (менше за 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; хелатоутворювальні агенти, такі як ЕДТА; цукор, такий як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; протиіони, що створюють сіль, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як TWEEN™, PLURONIC™ або поліетиленгліколь (PEG). Фармацевтично прийнятні ексципієнти, крім того, описані в даному описі.

Композиції, описані в даному описі, можуть містити додаткові сполуки, які, як відомо, можна використовувати для лікування болю. Антагоніст NGF і НСПЗЗ і їх композиції можна також застосовувати в поєднанні з іншими засобами, які служать для посилення і/або доповнення ефективності засобів.

В інших варіантах здійснення даний винахід надає композиції (описані в даному описі) для застосування в будь-якому з способів, описаних в даному описі, або в контексті застосування як лікарський засіб, і/або використання для виготовлення лікарського засобу.

#### Набори

Винахід також надає набори для застосування в даних способах. Набори винаходу включають один або декілька контейнерів, що включають антагоніст NGF (такий як антитіло проти NGF), НСПЗЗ і в деяких варіантах здійснення, крім того, включають інструкції по застосуванню відповідно до будь-якого з способів, описаних в даному описі. У деяких варіантах здійснення набір включає антитіло проти NGF (таке як антитіло ЕЗ, описане в даному описі). В інших варіантах здійснення набір включає антитіло проти NGF, що включає один або декілька CDR антитіла ЕЗ (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 або, в деяких варіантах здійснення, всі 6 CDR з ЕЗ). Набір може, крім того, включати опис відбору індивідуума, що підлягає лікуванню, на основі ідентифікації того, чи є у індивідуума біль або чи є у індивідуума ризик болю. В деяких варіантах здійснення винахід надає набори для застосування з будь-яким із способів, описаних в даному описі, причому вказаний набір включає антагоніст NGF. У ще одних варіантах здійснення

набір включає антитіло проти NGF. У ще одних варіантах здійснення набір включає гуманізоване антитіло проти NGF (таке як антитіло E3, описане в даному описі). У ще одних варіантах здійснення інструкції включають опис введення антагоніста NGF в поєднанні з НСПЗЗ для лікування, профілактики і/або полегшення будь-якого болю (такого як післяопераційний біль, біль, пов'язаний з опіком, ревматоїдним артритом або остеоартритом).

У деяких варіантах здійснення набір включає антагоніст NGF (такий як антитіло проти NGF), НСПЗЗ і інструкції по введенню антагоніста NGF і НСПЗЗ одночасно і/або послідовно для ефективного лікування болю. В іншому варіанті здійснення набір включає антагоніст NGF (такий як антитіло проти NGF) і інструкції по введенню антагоніста NGF (такого як антитіло проти NGF) і НСПЗЗ в поєднанні один з одним для ефективного лікування болю. В інших варіантах здійснення набір включає антагоніст NGF (такий як антитіло проти NGF), і НСПЗЗ (такий як ібупрофен) і інструкції по введенню антагоніста NGF і НСПЗЗ в поєднанні один з одним для ефективного лікування болю. Відповідно, будь-які способи, описані в даному описі, можуть бути відображені в інструкціях.

У деяких варіантах здійснення набір включає антитіло проти NGF. В інших варіантах здійснення антитіло проти NGF являє собою антитіло, що включає варіабельну область важкого ланцюга, показану в таблиці 1, і варіабельну область легкого ланцюга, показану в таблиці 2. В ще одних варіантах здійснення антитіло проти NGF являє собою антитіло E3, як описане в даному описі.

Антагоніст NGF (такий як антитіло проти NGF) і НСПЗЗ можуть бути присутніми в окремих контейнерах або в одному контейнері. Зрозуміло, що набір може включати одну окрему композицію або дві або більше композицій, причому одна композиція включає антагоніст NGF і одна композиція включає НСПЗЗ.

Набори даного винаходу знаходяться у відповідній упаковці. Відповідна упаковка включає, але не обмежується, флакончики, пляшки, банки, гнучку упаковку (наприклад, запаяні мішечки Mylar або пластикові мішечки) і їм подібні. Набори можуть необов'язково містити додаткові компоненти, такі як буфери і інтерпретаційна інформація.

Інструкції, що відносяться до застосування антагоніста NGF, загалом включають інформацію по дозуванню, схемі введення і шляху введення для передбачуваного лікування. Контейнери можуть являти собою стандартні дози, насипні упаковки (наприклад, багатодозові упаковки) або субстандартні дози. Інструкції, що поставляються в наборах винаходу, являють собою звичайно письмові інструкції на етикетці або вкладиші упаковки (наприклад, лист паперу, включений в набір), але також прийнятні інструкції, що зчитуються машиною (наприклад, інструкції на магнітному або оптичному диску зберігання інформації).

Етикетка або вкладиш упаковки вказує, що композиція застосовується для лікування,

полегшення і/або профілактики болю (включаючи післяопераційний біль). Інструкції можуть бути надані для здійснення будь-якого з способів, описаних в даному описі.

Набори даного винаходу знаходяться у відповідній упаковці. Відповідна упаковка включає, але не обмежується, флакончики, пляшки, банки, гнучку упаковку (наприклад, запаяні мішечки Mylar або пластикові мішечки) і їм подібні. Передбачені також упаковки для використання в комбінації зі спеціальним пристроєм, таким як інгалятор, пристрій для інтраназального введення (наприклад, розпилювач) або інфузійний пристрій, такий як мінінасос. Набір може мати стерильний канал доступу (наприклад, контейнер може являти собою мішечок або флакончик з розчином для внутрішньовенного введення, що має пробку, що проколюється голкою для підшкірних ін'єкцій). Контейнер може також мати стерильний канал доступу (наприклад, контейнер може являти собою мішечок або флакончик з розчином для внутрішньовенного введення, що має пробку, що проколюється голкою для підшкірних ін'єкцій). Щонайменше, один активний засіб в композиції являє собою антагоніст NGF, такий як антитіло проти NGF. Контейнер може, крім того, включати другий фармацевтично активний засіб.

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

У деяких варіантах здійснення винахід надає виготовлені вироби, що включають вміст описаних вище наборів. В деяких варіантах здійснення набори включають антагоніст NGF (такий як антитіло проти NGF) і/або НСПЗЗ з інформацією, що вказує застосування для лікування болю (в поєднанні один з одним).

Введення антагоніста NGF і НСПЗЗ і оцінка лікування

Антагоніст NGF і НСПЗЗ можна вводити індивідууму будь-яким прийнятним шляхом. Наприклад, їх можна вводити разом або окремо, перорально, внутрішньовенно, сублінгвально, підшкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньом'язово, інтраназально, ректально, інтраторакально, внутрішньоочеревинно, в шлуночки головного мозку, трансдермально або шляхом інгаляції. Їх можна вводити перорально, наприклад, в формі таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, вафель, жувальної гумки, льодяників на паличці, супозиторіїв або їм подібних, отриманих процедурами, визнаними в даній галузі. Для фахівця в даній галузі буде очевидно, що описані в даному описі приклади не призначені бути такими, що обмежують, але лише ілюструють методику, що є.

Відповідно, в деяких варіантах здійснення антагоніст NGF, такий як антитіло проти NGF, вводиться індивідууму відповідно до відомих способів, таких як внутрішньовенне введення, наприклад, у вигляді болюсу або безперервним вливанням протягом періоду часу, внутрішньом'язовим, внутрішньоочеревинним, в

спинний мозок, підшкірним, внутрішньосуглобовим, внутрішньосиновіальним, підболонковим, пероральним, інгаляційним або місцевим шляхами. Найвні в продажу розпилювачі для рідких композицій, включаючи струменеві розпилювачі і ультразвукові розпилювачі, можна використовувати для введення. Рідкі композиції можуть розпилюватися безпосередньо, а ліофілізований порошок може розпилюватися після розчинення. Альтернативно, антагоніст NGF (такий як антитіло проти NGF) може бути введений у вигляді аерозолу з використанням фторкарбонної композиції і інгалятора відміряної дози, або інгаляційно у вигляді ліофілізованого і меленого порошка.

Методики сайт-специфічної або націленої локальної доставки можна також використовувати для введення. Приклади методик сайт-специфічної або націленої локальної доставки включають різні імплантовані депоновані джерела антагоніста NGF і/або НСПЗЗ, або катетери локальної доставки, такі як інфузійні катетери, катетер, що імплантується, або голковий катетер, синтетичні трансплантати, адвентиційні обгортки, шунти або інші пристрої, що імплантуються, сайт-специфічні носії, пряму ін'єкцію, використання методики або пристрою анальгезії, керованої пацієнтом (PCA), і/або пряме нанесення [див., наприклад, публікацію PCT №WO 00/53211 і патент США №5981568].

Для введення можна застосовувати різні композиції засобів (антагоністів NGF), таких як антитіла проти NGF, або їх фрагменти. У деяких варіантах здійснення засоби, такі як антитіла проти NGF, або їх фрагменти, можна вводити без добавок. У деяких варіантах здійснення засоби, що включають антитіло проти NGF, можуть бути в різних композиціях, включаючи композиції, що включають фармацевтично прийнятний ексципієнт. Фармацевтично прийнятні ексципієнти відомі в даній галузі і являють собою відносно інертні речовини, які сприяють введенню фармакологічно активної речовини. Наприклад, ексципієнт може додати форму або консистенцію або діяти як розріджувач. Відповідні ексципієнти включають, але не обмежуються, засоби, що стабілізують, змочувальні і емульгуючі засоби, солі для зміни осмотичності, інкапсулючі засоби, буфери і підсилювачі проникності шкіри. Ексципієнти, а також композиції для парентеральної і непарентеральної доставки лікарських засобів викладені в [керівництві Remington, et al., The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)].

В деяких варіантах здійснення ці засоби (антагоністи NGF) складені в композиції для введення ін'єкцією (наприклад, внутрішньоочередово, внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньом'язово і т.д.). Відповідно, ці засоби можна комбінувати з фармацевтично прийнятними носіями, такими як сольовий розчин, розчин Рінгера, розчин декстрози і їм подібні. Конкретна схема дозування, тобто доза, час введення і повторення, будуть залежати від конкретного індивідуума і медичного анамнезу цього індивідуума. Схема введення (включаючи

використовуваний антагоніст (антагоністи) NGF) може варіюватися з часом.

Антитіла проти NGF можна вводити з використанням будь-якого відповідного способу, включаючи ін'єкцію (наприклад, внутрішньоочередово, внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньом'язово і т.д.). Антитіла проти NGF можна вводити інгаляцією, як описано в даному описі. Загалом, для введення антитіл проти NGF початкове можливе дозування може складати приблизно 0,2мг/кг або приблизно 2мг/кг. У деяких варіантах здійснення звичайне добове дозування може знаходитися в 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 згаданих вище чинників. Для повторних введень протягом декількох днів або більше, в залежності від стану, лікування продовжується доти, поки не станеться бажане пригнічення симптомів захворювання або доти, поки не будуть досягнуті терапевтичні рівні, достатні для зменшення болю. Ілюстративна схема введення включає введення початкової дози приблизно 2мг/кг з подальшою щотижневою підтримуючою дозою приблизно 1мг/кг антитіла проти NGF або з подальшою підтримуючою дозою приблизно 1мг/кг кожен другий тиждень. Однак можна використовувати інші схеми введення, в залежності від типу фармакокінетичного розпаду, якого бажає досягнути лікар. Інші схеми введення включають схему до 1 разу в день, від 1 до 4 разів на тиждень, або менш часто. В деяких варіантах здійснення сполуки вводяться приблизно однократно на тиждень, приблизно від 1 до 4 разів на місяць. Дозування антитіл проти NGF описане в даному описі. Хід лікування легко контролюється звичайними методиками і аналізами.

В деяких варіантах здійснення, коли він не являє собою антитіло, антагоніст NGF відповідно до винаходу можна вводити в кількості від 0,1 до 300мг/кг маси тіла пацієнта, розділених на 1-3 дози 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 цього індивідуума, а також від властивостей окремих засобів (таких як період напіввиведення засобу та інші міркування, добре відомі в даній галузі).

НСПЗЗ можна вводити на рівні дозування до звичайних рівнів дозування для таких анальгетиків. У деяких варіантах здійснення НСПЗЗ вводиться на зниженому рівні. Відповідні рівні дозування будуть залежати від знеболювального ефекту вибраного НСПЗЗ, але звичайно прийнятні рівні складають приблизно від 0,001 до 25мг/кг/день, приблизно від 0,005 до 10мг/кг/день, або приблизно від 0,05 до 1мг/кг/день, або менше. Сполуку можна вводити по схемі до 6 разів на день (або більше), 1-4 рази на день, або її можна вводити менш часто. В деяких варіантах здійснення НСПЗЗ вводиться безперервно або дуже часто (наприклад, як при PCA).



При введенні в комбінації або у вигляді однієї, або у вигляді окремої композиції (композицій), антагоніст фактора росту нервів і НСПЗЗ присутні в співвідношенні, яке узгоджується з проявом бажаного ефекту. В деяких варіантах здійснення співвідношення по масі між антагоністом фактора росту нервів і НСПЗЗ становитиме приблизно 1 до 1. В деяких варіантах здійснення це співвідношення може складати між приблизно 0,001 до приблизно 1 і приблизно 1000 до приблизно 1, приблизно 0,01 до приблизно 1 і 100 до приблизно 1, або приблизно 0,1 до приблизно 1 і приблизно 10 до приблизно 1. Передбачені інші співвідношення. Потрібно розуміти, що кількість антагоніста фактора росту нервів і НСПЗЗ, необхідна для застосування при лікуванні аїю профілактиці болю, буде варіюватися не тільки в залежності від конкретних вибраних сполук або композицій, але також від шляху введення, природи стану, що піддається лікуванню, і віку і стану пацієнта, курсу або стадії лікування, і в кінцевому результаті, воно буде визначатися за розсудом лікуючого лікаря. Наприклад, відповідне дозування антагоніста NGF (такого як антитіло проти NGF) буде залежати від використовуваного антагоніста (антагоністів) NGF (або їх композицій), типу і тяжкості болю, який передбачається лікувати, від того, чи вводиться засіб в профілактичних або терапевтичних цілях, попередньої терапії, клінічного анамнезу пацієнта і реакції на засіб і за розсудом лікуючого лікаря. Звичайно клініцист буде вводити антагоніст NGF (такий як антитіло проти NGF) доти, поки не буде досягнуте дозування, яке отримує бажаний результат.

Емпіричні міркування, такі як період напіввиведення, загалом будуть впливати на визначення дозування. Наприклад, антитіла, які сумісні з імунною системою людини, такі як гуманізовані антитіла або повністю людські антитіла, можна застосовувати для подовження періоду напіввиведення антитіла і для профілактики атаки антитіла імунною системою хазяїна. Частоту введення можна визначити і підібрати протягом курсу лікування, і вона загалом, але необов'язково, заснована на лікуванні і/або пригніченні, і/або полегшенні, і/або затримці виникнення болю. Альтернативно, можуть бути доцільні композиції антагоніста NGF і/або НСПЗЗ тривалого безперервного вивільнення. В даній галузі відомі різні композиції і пристрої для досягнення тривалого вивільнення.

В одному варіанті здійснення дозування для антагоніста NGF можна визначити емпірично у індивідуумів, яким було зроблене одне або декілька введень засобу, який інгібує активність NGF, для лікування болю. Індивідуумам вводять зростаюче дозування засобу, який інгібує NGF, наприклад, антитіла проти NGF, в поєднанні з НСПЗЗ. Для оцінки ефективності лікування можна стежити за показником болю.

Введення антагоніста NGF і/або НСПЗЗ у відповідності зі способом даного винаходу може бути безперервним або переривистим, в залежності, наприклад, від фізіологічного стану реципієнта. Від того, чи є мета введення

терапевтичною або профілактичною, і від інших чинників, відомих досвідченим практикам. Введення антагоніста NGF може бути по суті безперервним протягом заздалегідь вибраного періоду часу, або воно може виготовлятися у вигляді серії доз, що вводяться через проміжок часу, наприклад, або до, під час або після розвитку болю; до і після; під час і після; до і під час; або до, під час і після розвитку болю. Наприклад, введення може здійснюватися до, під час і/або після поранення, порізу, травми, операції і будь-якого іншого явища, яке, ймовірно, викличе розвиток болю.

В деяких варіантах здійснення можуть бути присутніми більше одного антагоніста NGF, такого як антитіло. Антагоністи можуть бути однаковими або відрізнятися один від одного. Могуть бути присутніми, щонайменше, 1, щонайменше, 2, щонайменше, 3, щонайменше, 4, щонайменше, 5 або більше різних антагоністів NGF. Загалом, ці антагоністи NGF мають додаткову активність, яка не чинить їх несприятливого ефекту один на одного. Антагоністи NGF можна також застосовувати в поєднанні з іншими засобами, які служать для посилення і/або доповнення ефективності засобів.

В деяких варіантах здійснення можуть бути присутніми більше одного НСПЗЗ. НСПЗЗ можуть бути однаковими або відрізнятися один від одного. Могуть бути присутніми, щонайменше, 1, щонайменше, 2, щонайменше, 3, щонайменше, 4, щонайменше, 5 або більше різних НСПЗЗ. В цілому, ці НСПЗЗ мають додаткову активність, яка не чинить їх несприятливого ефекту один на одного. НСПЗЗ можна також застосовувати в поєднанні з іншими засобами, які служать для посилення і/або доповнення ефективності засобу (засобів).

Терапевтичні композиції антагоніста NGF (такого як антитіло) і НСПЗЗ, що застосовуються відповідно до даного винаходу, готують для зберігання змішуванням антитіла, що має бажаний ступінь чистоти, з необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами [Remington, et al., The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)] в формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори нетоксичні для реципієнтів у використовуваних дозуванні і концентраціях і можуть включати буфери, такі як фосфат, цитрат та інші органічні кислоти; солі, такі як хлорид натрію, антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (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 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 вуглеводні, включаючи глюкозу, манозу або декстран; хелатоутворювальні агенти, такі як ЕДТА; цукор, такий як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; протиіони, що утворюють сіль, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або не іонні поверхнево-активні речовини, такі як TWEEN™, PLURONICS™ або поліетиленгліколь (PEG).

Ліпосоми, що містять антагоніст NGF (такий як антитіло) отримують способами, відомими в даній галузі, такими як описано в [публікаціях Epstein, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); і патентах США №№ 4485045 і 4544545]. Ліпосоми із збільшеним часом циркуляції розкриті в [патенті США №5013556]. Особливо корисні ліпосоми можна генерувати способом випарювання в оберненій фазі ліпідної композицією, що включає фосфатидилхолін, холестерин і дериватизований PEG фосфатидилетаноламін (PEG-PE). Ліпосоми піддають екструзії через фільтри з певним розміром пор для отримання ліпосом з бажаним діаметром.

Активні інгредієнти можуть також укладатися в мікрокапсули, отримані, наприклад, методиками коацервації або міжповерхневої полімеризації, наприклад, відповідно гідроксиметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули і полі(метилметацилатні) мікрокапсули, в колоїдних системах доставки лікарських засобів (наприклад, ліпосомах, альбумінових мікросферах, мікроемulsіях, наночастинках і нанокapsулах) або в макроемulsіях. Такі методики розкриті в [керівництві Remington, et al., The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)].

Можна отримати засоби пролонгованого вивільнення. Відповідні приклади засобів пролонгованого вивільнення включають напівпроникну матрицю твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, причому матриці представлені у вигляді виробів, що мають певну форму, наприклад, плівки або мікрокапсули. Приклади матриць пролонгованого вивільнення включають поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксіетилметакрилат) або полівініловий спирт), полілактиди [патент США №3773919], співполімери L-глутамінової кислоти і 7-етил-L-глутамату, етиленвінілацетат, що не розкладається, співполімери молочної кислоти-гліколевої кислоти, що розкладаються, такі як LUPRON DEPOT™ (мікросфери, які вводяться ін'єкцією, що складаються з співполімера молочної кислоти-гліколевої кислоти і ацетату лейпроліду), ацетатізобутират сахарози і полі-D-(-)-3-гідроксимасляна кислота.

Композиції, що підлягають застосуванню для введення *in vivo*, повинні бути стерильними. Це легко здійснюється, наприклад, фільтрацією через мембрани стерилізуючої фільтрації. Терапевтичні композиції антагоніста NGF (такого як антитіло проти NGF) загалом вміщуються в контейнер, що має канал стерильного доступу, наприклад, мішечок з розчином для внутрішньовенних ін'єкцій

або флакончик, що має пробку, що проколюється голкою для підшкірних ін'єкцій.

Композиції відповідно до даного винаходу можуть бути представлені у вигляді стандартних лікарських форм, 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 таблетуючими інгредієнтами, таким як кукурудзяний крохмаль, лактоза, сахароза, сорбіт, тальк, стеаринова кислота, стеарат магнію, дикальційфосфат або смоли, та іншими фармацевтичними розріджувачами, наприклад, водою, для утворення твердої заздалегідь складеної композиції, що містить однорідну суміш сполуки даного винаходу або її нетоксичну фармацевтично прийнятну сіль. При назві цих фармацевтичних композицій «однорідними» мається на увазі, що активний інгредієнт рівномірно диспергований по всій композиції так, що композицію можна легко поділити на однаково ефективні стандартні лікарські форми, такі як таблетки, пілюлі і капсули. Цю тверду заздалегідь складену композицію потім поділяють на стандартні лікарські форми описаного вище типу, що містять від приблизно 0,01мг до приблизно 0,1мг до приблизно 500мг активного інгредієнта даного винаходу. Таблетки або пілюлі нової композиції можна покрити або компаундувати іншим чином для надання лікарської форми, що має перевагу пролонгованої дії. Наприклад, таблетка або пілюля може включати компонент внутрішнього дозування і зовнішнього дозування, причому останній представлений в формі оболонки навколо першого. Ці два компоненти можуть відділятися ентросолюбільним шаром, який служить для протидії руйнуванню в шлунку і забезпечує можливість внутрішньому компоненту пройти інтактним в 12-палу кишку або відстрочити вивільнення. Для таких ентросолюбільних шарів або покриттів можна використати різноманітні матеріали, причому такі матеріали включають ряд полімерних кислот і сумішей полімерних кислот з такими матеріалами, як шелак, цетиловий спирт і ацетат целюлози.

Рідкі форми, в яких композиції даного винаходу можуть бути включені для перорального введення або ін'єкцією, включають водні розчини, відповідним чином ароматизовані сиропи, водні або масляні суспензії і ароматизовані емulsії з харчовими оліями, такими як олія сім'я бавовни, кунжутна олія, кокосова олія або арахісова олія, а також еліксири і аналогічні фармацевтичні носії. Відповідні диспергуючі або суспендуєчі засоби для водних суспензій включають синтетичні і природні смоли, такі як трагакант, акація, альгінат, декстран, карбоксиметилцелюлоза, натрію, метилцелюлоза, полівінілпіролідон або желатин. Активні інгредієнти можуть також бути включені в продукти контрольованого вивільнення, що мають високу в'язкість, такі як ацетатізобутират сахарози

або інші. Ці композиції можна використати або для перорального введення, або для ін'єкцій. Ін'єкція може привести до утворення локального депо засобу, який вивільняється локально протягом періоду від 1 дня до 3 місяців.

Композиції для введення ін'єкцією включають композиції, що містять антагоніст NGF і НСПЗЗ як активні інгредієнти в поєднанні з поверхнево-активним агентом (або змочувальним агентом, або поверхнево-активною речовиною) або в формі емульсії (у вигляді емульсії води в маслі або масла у воді).

Відповідні поверхнево-активні агенти включають, зокрема, неіонні агенти, така як поліоксіетиленсорбітани (наприклад, Tween™ 20, 40, 60, 80 або 85) та інші сорбітани (наприклад, Span™ 20, 40, 60, 80 або 85). Композиції з поверхнево-активним агентом можуть містити від 0,05 до 5% поверхнево-активного агента, або від 0,1 до 2,5%. Слід розуміти, що при необхідності можна додавати інші інгредієнти, наприклад, маніт або інші фармацевтично прийнятні носії.

Відповідні 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 в олії (наприклад, олії соєвих бобів, олії сафлора, олії сім'я бавовни, кунжутній олії, кукурудзяній олії або мигдалевій олії) і емульсії, утвореній після змішування з фосфоліпідом (наприклад, яєчними фосфоліпідами, фосфоліпідами соєвих бобів або лецитином соєвих бобів) і водою. Потрібно розуміти, що можна додати інші інгредієнти, наприклад, гліцерин або глюкозу, для доведення тоничності емульсії. Відповідні емульсії звичайно повинні містити до 20% олії, наприклад, від 5 до 20%. Жирова емульсія може включати капельки 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.

В деяких варіантах здійснення композиції являють собою композиції, отримані змішуванням антагоніста фактора росту нервів з Intralipid™ або його компонентів (олії соєвих бобів, яєчних фосфоліпідів, гліцерину і води).

Композиції для інгаляції або інсуфляції включають розчини і суспензії в фармацевтично прийнятних, водних або органічних розчинниках, або їх суміші і порошки. Рідкі або тверді композиції можуть містити відповідні фармацевтично прийнятні ексципієнти, як викладено вище. Композиції вводять пероральним або інтраназальним респіраторним шляхом для локального або системного ефекту. Композиції в переважно стерильних фармацевтично прийнятних розчинниках можуть розпилюватися використанням газів. Розпилені розчини можуть вдихатися безпосередньо з розпилювального пристрою, або розпилювальний пристрій може бути прикріплений до лицьової маски, тенту або апарату періодичної штучної вентиляції легень під позитивним тиском. Композиції у вигляді розчину, суспензії або порошка можна вводити (включаючи

перорально або інтраназально) з пристроїв, які доставляють композицію відповідним чином.

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

Наступні приклади представлені для ілюстрації, а не обмеження винаходу.

Приклади

Приклад 1

Лікування моноклональним антитілом проти NGF в поєднанні з НСПЗЗ з приводу післяопераційного болю

Заявники використовували модель болю, яка імітує післяопераційний біль, для оцінки ефективності антитіла проти NGF в поєднанні з НСПЗЗ, ібупрофеном. Для кожного експеримента 16 самців дорослих щурів Sprague Dawley з масою тіла від 200 до 220г (Harlan; Indianapolis, IN) утримували в нормальних світлових умовах протягом, щонайменше, 1 тижня перед використанням при доступі без обмежень до їжі і води. Після 2-годинного періоду акліматизації в камерах тестування в день операції щурів ділили на дві групи: одна отримувала антитіло за 15 годин перед операцією, інша в це час отримувала носій (5% декстрозу/0,45% сольовий розчин по Фармакопії США). Антитіло 911 проти антагоніста NGF [див. Hongo, et al., Hybridoma 19:215-227 (2000)] вводили в дозі 1мг/кг маси тіла. Ібупрофен вводили в різних концентраціях в діапазоні від 10, 30, 100 до 300мг/кг (підшкірно) через 24 години після операції всім тваринам.

Операція була заснована на процедурі, описаній [Brennan, et al., Pain 64:493-501 (1996)]. Тварин анестезували 2% ізофлюраном і повітряною сумішшю, яку підтримували під час операції, через носову воронку. Підшовну поверхню правої задньої лапи готували тампоном з повідом-йодом, проводили центральний поздовжній розріз довжиною 1см через шкіру і фасцію, починаючи в 0,5см від краю п'ятки і продовжуючи до пальців стопи. Вимірювання проводили лінійкою при стопі, що утримується в зігнутому положенні. Підшовний м'яз підіймали з використанням пінцета із зігненими браншами, і в ньому проводили поздовжній розріз. М'яз розрізали на повну глибину, між місцем його відходження і ділянкою прикріплення. Кровотечу зупиняли під час всієї операції тиском, що чинився за допомогою марлевого тампона. Рану закривали двома матрацними швами (чорна одноволоконна нитка "Ethicon" 5-0). Ці шовні нитки зав'язували вузлами 5-6 разів при першому вузлі, затягнутому нещільно. Ділянку рани протирали розчином бацитрацину. Тваринам давали можливість відновитися і знаходитися в спокої в чистих клітках протягом 22 годин перед тим як починалося поведінкове тестування.

Для кожного експерименту тварин ділили на дві групи (контрольну і що отримувала лікування антитілом). Антитіло проти NGF вводили за 15 годин перед операцією. Біль в спокої оцінювали через 22 години після операції в обох групах («вихідний стан» в наступних графіках). Через 20 годин після операції всіх тварин потім лікували ібупрофеном в дозі 10, 30, 100 або 300мг/кг

(підшкірно). Біль в спокої оцінювали, починаючи через 1 годину після лікування ібупрофеном.

Біль в спокої оцінювали в різний час після операції з використанням кумулятивної бальної оцінки болю. Щурів вміщували на пластикову сітку (решітку: 8мм<sup>2</sup>) в прозорій пластиковій клітці і давали можливість акліматизуватися протягом 15-20 хвилин. Поведінку оцінювали по шкалі від 0 до 2. Бальну оцінку 0 давали, якщо тварина спиралася на розрізану лапу, за даними оцінки, якщо зазначалося, що лапа блідніла або упиралася в решітку. Бальну оцінку 1 давали, якщо тварина щадила лапу при шкірі, що лише торкалась решітки без збліднення або поглиблень шкіри. Бальну оцінку 2 давали, якщо лапа утримувалася, повністю не торкаючись решітки. Кожну тварину спостерігали протягом 1 хвилини через кожні 5 хвилин протягом 30 хвилин. Суму з 6 балів (всього 0-12), отриману протягом 1/2 години використовували для оцінки болю в розрізаній стопі.

Результати цих експериментів показані в таблиці 1 і на Фіг.1.

Кумулятивна бальна оцінка болю у тварин після лікування ібупрофеном в дозі 0, 10мг/кг, 30мг/кг, 100мг/кг або 300 вигляді середньої величини ( $\pm$ стандартне відхилення). Д дисперсійного аналізу, а потім окремі пари аналізували з порівнянь з використанням прогр.

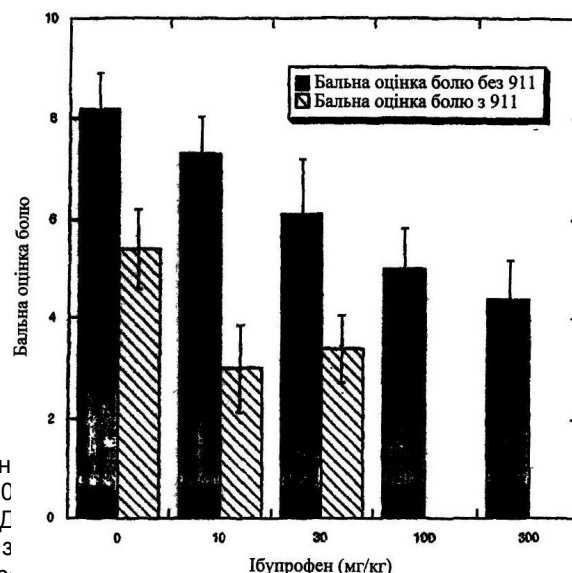
	Вихідний рівень	10мг/кг
Mab911	5,4(0,8)	3(0,87)
Контроль	8,2(0,72) $p<0,001$	7,3(0,73) $p<0,001$

Як показано в таблиці 1, бальна оцінка болю в спокої для щурів, що отримували лікування Mab 911 (в дозі 1мг/кг), була суттєво нижче, ніж в контролі без ібупрофену ( $p<0,001$ ). Аналогічним чином, бальна оцінка болю в спокої при лікуванні Mab 911 в дозі 1мг/кг і 10мг/кг ібупрофену була суттєво нижче, ніж при лікуванні одним ібупрофеном в дозі 10мг/кг ( $p<0,001$ ); і бальна оцінка болю в спокої при лікуванні Mab 911 в дозі 1мг/кг і 30мг/кг ібупрофена була суттєво нижче, ніж при лікуванні одним ібупрофеном в дозі 30мг/кг ( $p<0,05$ ). На Фіг.1 представлена бальна оцінка болю в спокої, виміряна у тварин при лікуванні антитілом проти NGF в дозі 1мг/кг і без нього і при лікуванні різними дозами ібупрофену і без нього. Передопераційне лікування антитілом проти NGF і ібупрофеном більш ефективне в зменшенні болю в спокої, ніж один ібупрофен або лікування одним антитілом. Вважається, що лікування Mab 911 (1мг/кг) в комбінації з ібупрофеном в дозі 10мг/кг, щонайменше, також ефективне, як один ібупрофен в дозі 300мг/кг.

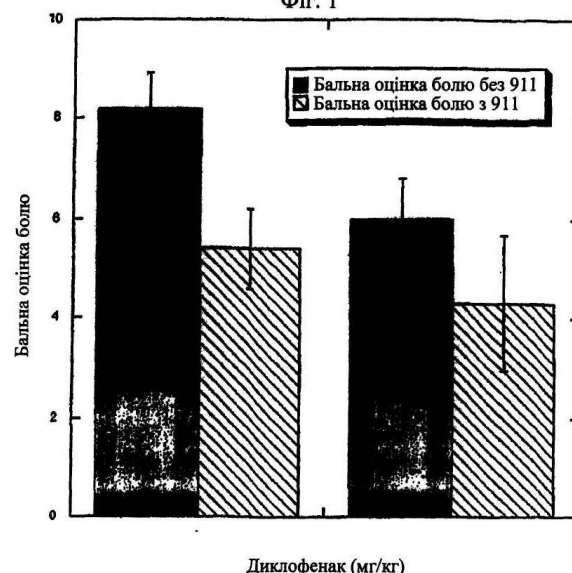
Для випробування ефекту лікування моноклональним антитілом 911 проти NGF в поєднанні з диклофенаком для лікування післяопераційного болю експерименти проводили, як описано вище, за винятком того, що тваринам вводили носій або диклофенак в дозі 5мг/кг замість ібупрофену. Результати показані на Фіг.2.

Зменшення бальної оцінки болю спостерігалось для середньої величини при лікуванні і 911 в дозі 1мг/кг, і диклофенаком в дозі 5мг/кг, в порівнянні з лікуванням одним диклофенаком в дозі 5мг/кг.

Хоч представлений вище винахід був описаний з певними деталями як ілюстрація і приклад з метою ясності розуміння, описи і приклади не повинні розглядатися як такі, що обмежують діапазон винаходу.



Фіг. 1



Фіг. 2