



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1723039 B

(45) 授权公告日 2013.01.16

(21) 申请号 200380105336.4

(22) 申请日 2003.10.08

(30) 优先权数据

60/417,237 2002.10.08 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.06.07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2003/032089 2003.10.08

(87) PCT申请的公布数据

W02004/032870 EN 2004.04.22

(73) 专利权人 里纳特神经系统学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D·L·谢尔顿 G·J·韦尔加拉

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 魏永良

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 0178698, 2001.10.25, 说明书第6-10

页, 权利要求书.

US 2002/0028779 A1, 2002.03.07, 说明书第2页第一段.

Brennan et al., Role of nerve growth factor in a rat model for postoperative pain, Societh for neuroscience abstracts 24, 1.1998, 24(1), 全文.

审查员 潘爱群

权利要求书 1 页 说明书 33 页 附图 8 页

(54) 发明名称

抗神经生长因子抗体拮抗剂在制备治疗手术后疼痛的药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了通过施用神经生长因子 (NGF) 的拮抗剂来预防或治疗由手术或切割所致疼痛的方法和组合物。NGF 拮抗剂可以是能够结合 hNGF 的抗 NGF (诸如抗 hNGF) 抗体。

1. 有效量的抗神经生长因子抗体拮抗剂在制备用于抑制或改善个体中手术后静止痛的药物中的用途。
2. 有效量的抗神经生长因子抗体拮抗剂在制备用于抑制或改善个体中手术后机械性诱导的疼痛的药物中的用途。
3. 有效量的抗神经生长因子抗体拮抗剂在制备用于抑制或改善个体中手术后静止痛和机械性诱导的疼痛的药物中的用途。
4. 权利要求 3 的用途,其中所述药物还同时抑制或改善个体中手术后热诱导的疼痛。
5. 权利要求 1-4 中任一项的用途,其中抗神经生长因子抗体拮抗剂是人抗体。
6. 权利要求 1-4 中任一项的用途,其中抗神经生长因子抗体拮抗剂是人源化抗体。
7. 权利要求 1-4 中任一项的用途,其中所述个体是人类。

抗神经生长因子抗体拮抗剂在制备治疗手术后疼痛的药物中的应用

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2002 年 10 月 8 日提交的美国临时专利申请流水号 60/417,237 的优先权利益,所述申请内容全文引入作为参考。

[0003] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0004] 根据合同号 DAAD19-03-C-0006,本发明通过 DARPA 得到美国政府的支持。美国政府在本发明中可以享有某些权利。

发明领域

[0005] 本发明涉及神经生长因子 (NGF) 拮抗剂用于预防、改善或治疗手术后疼痛的用途。

[0006] 发明背景

[0007] 神经生长因子 (NGF) 是第一个被鉴定的神经营养蛋白,其在外周和中枢神经元的发育和生存中的作用已经得到很好的特征描述。已经证实,NGF 是外周交感和胚胎感觉神经元以及基底前脑胆碱能神经元的发育中至关重要的生存和维持因子 (Smeyne 等, Nature 368 :246-249(1994) ;Crowley 等, Cell 76 :1001-1011(1994))。NGF 上调神经肽在感觉神经元中的表达 (Lindsay,等, Nature 337 :362-364(1989)),其活性通过两种不同的膜结合受体 (TrkA 酪氨酸激酶受体和 p75 受体) 介导,所述 p75 受体在结构上与肿瘤坏死因子受体家族的其它成员相关 (Chao,等, Science 232 :518-521(1986))。

[0008] 除了对神经系统的作用外,NGF 越来越多地被提示涉及神经系统外的过程。例如,已经证实,NGF 能增强血管通透性 (Otten 等, Eur J Pharmacol. 106 :199-201(1984)),增强 T 细胞和 B 细胞免疫应答 (Otten,等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :10059-10063(1989)),诱导淋巴细胞分化和肥大细胞增殖以及导致可溶性生物信号从肥大细胞释放 (Matsuda,等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :6508-6512(1988) ;Pearce, 等, J Physiol. 372 :379-393(1986) ;Bischoff 等, Blood 79 :2662-2669(1992) ;Horigome, 等, J Biol. Chem. 268 :14881-14887(1993))。虽然已经证实,外源性加入的 NGF 能够具有全部这些作用,然而重要的是要注意到,仅极少证实内源性 NGF 在体内任何这些过程中具有重要作用 (Torcia,等, Cell. 85(3) :345-56(1996))。因此,抑制内源性 NGF 的生物活性的作用 (若有的话) 尚未明确。

[0009] NGF 由多种细胞类型产生,包括肥大细胞 (Leon 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :3739-3743(1994)), B 淋巴细胞 (Torcia 等, Cell 85 :345-356(1996)), 角质形成细胞 (Di Marco 等, J Biol. Chem. 268 :22838-22846)), 平滑肌细胞 (Ueyama,等, J Hypertens. 11 :1061-1065(1993)), 成纤维细胞 (Lindholm,等, Eur. J. Neurosci. 2 :795-801(1990)), 支气管上皮细胞 (Kassel,等, Clin. Exp. Allergy 31 :1432-40(2001)), 肾小球系膜细胞 (Steiner 等, Am. J Physiol. 261 :F792-798(1991)) 和骨骼肌肌管 (Schwartz,等, JPhotochem, Photobiol. B 66 :195-200(2002))。在神经系统以外的多种细胞类型上发现了

NGF 受体。例如,在人类单核细胞,T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞和肥大细胞上已发现了 TrkA。

[0010] 在人类患者以及在一些动物模型中已经观察到增加的 NGF 水平和多种炎症病症之间的关联。这包括系统性红斑狼疮 (Bracci-Laudiero, 等, *Neuroreport* 4 : 563-565(1993)), 多发性硬化 (Bracci-Laudiero, 等, *Neurosci. Lett.* 147 :9-12(1992)), 银屑病 (Raychaudhuri, 等, *Acta Derm. l' enereol.* 78 :84-86(1998)), 关节炎 (Falcimi, 等, *Ann. Rheum. Dis.* 55 :745-748(1996)), 间质性膀胱炎 (Okragly, 等, *J. Urology* 161 : 438-441(1991)) 和哮喘 (Braun, 等, *Eur. J Immunol.* 28 :3240-3251(1998))。

[0011] 一致性地,外周组织中 NGF 水平增高与炎症相关,并已经在多种形式的关节炎中观察到。受类风湿性关节炎影响的患者的滑膜表达高水平的 NGF,而在未发炎的滑膜中,已有报道滑膜 NGF 是无法检测到的 (Aloe, 等, *Arch. Rheum.* 35 :351-355(1992))。在实验性诱导类风湿性关节炎的大鼠中也观测到相似的结果 (Aloe 等, *Clin. Exp. Rheumatol.* 10 : 203-204(1992))。已有报道显示,在转基因关节炎小鼠中,NGF 的水平增高并且肥大细胞数量增加 (Aloe, 等, *Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects* 15 :139-143(1993))。

[0012] 外源性 NGF 治疗会导致疼痛和疼痛敏感性增加。这可通过如下事实得到说明:注射 NGF 在动物模型 (Amann 等, *Pain* 64,323-329(1996);Andreev, 等, *Pain* 63, 109-115(1995)) 和人类 (Dyck 等, *Neurology* 48,501-505(1997);Petty 等, *Annals Neurol.* 36,244-246(1994)) 中均会导致疼痛和疼痛敏感性的显著增加。NGF 通过多种机制发挥作用,所述机制包括诱导神经营养蛋白 BDNF (Apfel 等, *Mol. Cell. Neurosci.* 7(2), 134-142(1996);Michael 等, *J. Neurosci* 17,8476-8490(1997)), 而 BDNF 又改变脊髓中的疼痛信号处理 (Hains 等, *Neurosci Lett.* 320(3),125-8(2002);Miletic, 等, *Neurosci Lett.* 319(3),137-40(2002);Thompson 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 96(14), 7714-8(1999));诱导脊髓中的感觉神经元和其它传递疼痛的神经元的外周和中枢连接发生改变 (Lewin, 等, *European Journal of Neuroscience* 6,1903-1912(1994);Thompson, 等, *Pain* 62,219-231(1995));诱导轴突生长中的改变 (Lindsay, RM, *J Neurosci* 8(7),2394-405(1988));诱导缓激肽受体表达 (Peterson 等, *Neuroscience* 83 : 161-168(1998));诱导负责神经激活和传导的基因诸如离子通道的表达改变 (Boettger, 等, *Brain* 125(Pt2),252-63(2002);Kerr, 等, *Neuroreport* 12(14),3077-8(2001);Gould, 等, *Brain Res* 854(1-2),19-29(2000));增强疼痛相关受体 VR1 (Chuang 等, *Nature* 411(6840),957-62(2001) 和导致肌肉中的病理变化 (Foster, 等, *J Pathol* 197(2),245-55(2002))。多种这些改变直接发生在疼痛传导感觉神经元上,表面上不依赖于伴随的炎症。此外,至少有两种其它细胞类型已知对 NGF 应答,且可能涉及疼痛感觉或敏感性的改变。其一,肥大细胞,已被报道通过脱粒对 NGF 应答 (Yan, 等, *Clin. Sci. (Lond)* 80 :565-569(1991)) 或,在其它研究中,与其它因子合作导致或增加介质生成或释放 (Pearce 和 Thompson, *J. Physiol.* 372 :379-393(1986), Kawamoto, 等, *J. Immunol.* 168 : 6412-6419(2002))。已经清楚地证实,在大鼠中,由 NGF 介导的疼痛反应至少有几分由肥大细胞介导 (Lewin 等, *Eur. J. Neurosci.* 6 :1903-1912(1994), Woolf, 等, *J. Neurosci.* 16 : 2716-2723(1996),虽然这在人类中的可能关联性尚待发现。初级交感神经元也已知对 NGF 应答并也涉及疼痛的信号传导 (Aley, 等, *Neuroscience* 71 :1083-1090(1996))。很明显,除去交感神经支配将改变通常响应 NGF 治疗所见的痛觉过敏 (Woolf, 等, *J. Neurosci.* 16 :

2716-2723(1996))。

[0013] 每年有两千三百万患者接受手术操作。在手术位点的附近通常会发生疼痛。手术后疼痛具有两个临床上重要的方面,即静止痛 (resting pain) 或当患者不运动时的疼痛和机械性痛 (mechanical pain)——其会由运动 (咳嗽 / 喷嚏, 下床, 理疗等) 而加重。大外科手术疼痛处理的主要问题在于目前使用的药物具有多种显著的副作用, 其延缓康复, 延长住院时间并会将某些脆弱的患者群置于严重并发症的危险之中。手术后疼痛, 或在外科或创伤性损伤之后的疼痛是非常严重的且通常难以治疗的医学问题。

[0014] 治疗疼痛的药物疗法通常有两类, 其均有缺点。第一类包括非类固醇抗炎药 (NSAIDs), 其可用于治疗轻度或中度疼痛, 但其治疗用途受限于不良胃肠道反应诸如胃腐蚀、消化性溃疡形成或十二指肠和结肠的炎症。长期使用 NSAIDs 还会造成肾毒性, 此外, 如下述, 其治疗与特定情况相关或由特定情况引起的疼痛, 包括手术后疼痛不是非常有效。第二类包括吗啡和相关阿片样物质, 其可用于治疗中度至重度疼痛, 但其治疗用途受限于不良作用诸如镇静作用、意识错乱、便秘、呼吸抑制、肾绞痛、长期使用的耐受和成瘾性的危险。因此, 需要具有较少或不具有副作用的可用于治疗疼痛的化合物。

[0015] 疼痛通常被分类为“炎性”、“神经性”或“内脏性”, 但这些传统的概括性标签存在固有的问题。它们暗示在这些非常概括的类别中所有疼痛来源之间具有机理相似性或相同性。事实上, 存在多种不同类型的炎性疼痛以及既非炎性也非神经性的疼痛来源。此外, 具有炎性成分和 / 或传统上被称为“炎性疼痛”的疼痛类型并非意味着其它生理学方面对疼痛状态不起作用。例如, 骨关节炎和间质性膀胱炎按其名称是被定义为关节或膀胱的无菌炎性病症, 但很清楚地是, 与这两种病症相伴随的疼痛在机理上彼此非常不同。这可从给定类型的抗疼痛药物治疗这些疼痛类型时的不同效果中得到证明。大多数骨关节炎患者用 NSAIDs 可以得到良好的疼痛缓解 (至少开始是)。但是, NSAIDs 治疗在间质性膀胱炎中完全无效。

[0016] 手术后疼痛 (post-surgical pain) (可与术语“切割后疼痛” (post-incisional pain) 互换) 常被认为是各种炎性疼痛。虽然手术后疼痛可能存在“炎性”成分, 但很清楚地是, 其还涉及其它机制。例如, 在手术或其它损伤期间, 脉管系统和神经被切断或撕裂。这不发生在仅出现炎症的组织中。很清楚地, 切断神经会诱导正在进行中的活动, 其被感知为疼痛的。此外, 断裂血管导致组织相对缺血, 这也是在单独发生炎症期间不会出现的疼痛刺激。

[0017] 与炎症相比, 手术或损伤诱导的疼痛涉及不同机制, 这可通过两种状态中疼痛缓解的不同药理学以及潜在解剖学基础进行说明。Yamamoto, 等, (Brian Res. 909(1-2) : 138-144(2001)) 已经指出, 对脊髓 N-乙酰- α 连接的酸性二肽酶 (NAALADase) 的抑制可显著减轻伴随角叉菜聚糖注射的炎性刺激而出现的机械性疼痛。但是, 在平行试验中, 其中在切割后用相同方式抑制 NAALADase, 未发现机械性痛的减轻。这些现象表明手术后疼痛的根本生物化学或药理学与炎性疼痛的不同。在手术后和其它疼痛状态中还检测了在疼痛感觉调节中重要的解剖学结构 (Pogatzki, 等, Anesthesiology, 96(5) : 1153-1160 (May 2002))。脑干 (更具体的是 rostral medial medulla) 的递减影响是一般炎性, 神经性和内脏疼痛状态中继发痛觉过敏的重要调节因子。当脑干区受损时, 在切割后检测疼痛反应, 未发现疼痛反应有任何变化。这些结果显示切割后的原发和继发痛觉过敏不受来自 RMM

的递减影响的调节。腓肠肌切割后来自 RMM 的递减促进作用对继发痛觉过敏缺乏贡献,这支持了如下概念,即,切割引发的疼痛所涉及的机制不同于炎性和神经性疼痛。除了手术或损伤引发的疼痛与炎性、内脏性或神经性疼痛的明显不同外,这些结果也证实了手术后疼痛(或损伤引发的疼痛)所涉及的机制与其它疼痛明显不同。此外,在手术后疼痛治疗中特定药理学(或其它)干预手段的应用不能通过在炎性、内脏性或神经性疼痛模型中检测药理学药剂或干预手段来进行预测。

[0018] 手术后患者中还存在静止时的疼痛消散和活动及应答伤口位点处机械性刺激时的疼痛持续。(Moiniche,等,Acta Anaesthesiol. Scand. 41 :785-9(1997))。研究提示,由切割导致的静止疼痛和诱发疼痛可能由不同的传入神经纤维群和/或不同的受体进行传送。除了使用局部麻醉药来抑制这些引发的反应外,仅有少数药物可显著降低手术后咳嗽和运动带来的疼痛。

[0019] 实验性切割期间采用局部麻醉药进行预处理以阻滞疼痛,已被证实可以在初始时防止正在进行的疼痛和原发机械性痛觉过敏。当在损伤后注射利多卡因,也可消散来自切割的疼痛。然而,随着局部麻醉作用减弱,原发痛觉过敏复发。在患者中,在手术前实施的局部麻醉注射在降低疼痛方面大致上等效于在手术后实施的注射。(Moiniche,等,Anesthesiology 96 :725-41(2002))。

[0020] 在人类志愿者中的临床研究实验和临床前切割模型赞同:在切割之前或之后施用局部麻醉药大致上等效。中枢性疼痛传递神经元在切割期间的活化和致敏对于数日后的疼痛行为不是必需的。对于切割而言,中枢神经元的增强的反应性和疼痛更需要来自切口的正在进行的传入。在任何切割前镇痛药治疗减弱后,手术伤口表现出能再次引发致敏作用和产生疼痛反应。(Pogatzki,等,J Neurophysiol 87 :721(2002))。

[0021] 由切割导致的痛觉过敏区域(包括未损伤区)也已被描绘。继发痛觉过敏(损伤区域外的痛觉过敏)是对中枢神经系统反应性增强,即中枢致敏的一个量度。已经注意到,由切割导致的潮红或发红(可能是轴突反射的结果)的区域与痛觉过敏的区域不同。与静止疼痛和原发机械性痛觉过敏不同,当在切割前局部注射麻醉药时,从未出现大面积的痛觉过敏。此外,这也不能通过在切割后局部注射麻醉药而得到逆转。在手术后的患者中,在某些情况下,某些治疗可极大地减少痛觉过敏的区域,但不能极大地改变手术后疼痛的临床量(疼痛评分和阿片样物质的消耗)。已经证实,减少结肠切除术后痛觉过敏的区域不显著降低急性疼痛,但其与发生残留痛(即使是迟至结肠切除术后6个月)的患者的数量的降低相关。(De Kock,等,Pain 92 :373-80(2001))。

[0022] 已有报道描述了抗 NGF 抗体用于治疗慢性内脏性疼痛的用途。参见 PCT 专利公开号 WO 01/78698。Brennan 等报道了在手术后疼痛的大鼠模型中施用 TrkA 免疫粘合素。参见 Society for Neuroscience Abstracts 24(1-2)880(1998)。

[0023] 本文所引用的所有参考文件,包括专利申请和出版物均全文引入作为参考。

[0024] 发明概述

[0025] 本发明基于如下发现,NGF 的拮抗剂能有效治疗手术后疼痛。治疗涉及本文所述手术后疼痛的一个或多个方面。

[0026] 一方面,本发明涉及通过施用神经生长因子(NGF)的拮抗剂来预防或治疗手术后疼痛(又可称为“切割后”或“创伤后疼痛”)的方法。根据本发明,已显示出 NGF 拮抗剂

能过抑制或阻滞由手术后疼痛导致的疼痛,包括来自手术或来自切割性或创伤性伤口的疼痛。

[0027] 另一方面,本发明提供了在个体中减少手术后疼痛发生、改善手术后疼痛、缓解手术后疼痛和 / 或延缓手术后疼痛的发生和进展的方法,所述方法包括施用有效量的 NGF 拮抗剂。

[0028] 另一方面,本发明提供了在个体中增加疼痛阈值的方法,包括施用有效量的 NGF 拮抗剂。

[0029] 另一方面,本发明提供了在个体中增强手术和 / 或损伤引起的创伤性伤口的恢复的方法,包括施用有效量的 NGF 拮抗剂。

[0030] 在某些实施方案中,抑制、改善和 / 或防止静止痛,在某些实施方案中,抑制、改善和 / 或防止机械诱导的疼痛(包括由运动导致的疼痛),而在某些实施方案中,抑制、改善和 / 或防止热诱导的疼痛。在某些实施方案中,通过施用抗 NGF 抗体抑制、改善和 / 或防止机械诱导的疼痛。在某些实施方案中,通过施用抗 NGF 抗体抑制、改善和 / 或防止静止痛。在某些实施方案中,通过施用抗 NGF 抗体抑制、改善和 / 或防止热诱导的疼痛。在某些实施方案中,抑制、改善和 / 或防止异常性疼痛(即,对正常非有害刺激的反应增强(即,伤害性感觉增强)),和 / 或抑制、改善和 / 或防止痛觉过敏(即,对正常有害刺激或不适刺激的反应增强)。在其它实施方案中,异常性疼痛和 / 或痛觉过敏在性质上是热或机械(触觉)的,或是静止痛。在某些实施方案中,所述疼痛是慢性疼痛。在其它实施方案中,所述疼痛与切割、伤口或创伤位点相关,和 / 或邻近、位于或接近切割、伤口和 / 或创伤位点。

[0031] 本发明方法中适用的 NGF 拮抗剂是能够直接或间接导致 NGF 生物活性减弱的任何药剂。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂(例如,抗体)结合(物理上相互作用于)NGF、结合 NGF 受体(诸如 trkA 受体和 / 或 p75)和 / 或降低(阻碍和 / 或阻滞)下游 NGF 受体信号传导(例如,激酶信号传导抑制剂)。由此,在某些实施方案中,NGF 拮抗剂结合(物理上相互作用于)NGF。在其它实施方案中,NGF 拮抗剂结合 NGF 受体(诸如 TrkA 受体和 / 或 p75)。在其它实施方案中,NGF 拮抗剂降低(阻碍和 / 或阻滞)下游 NGF 受体信号传导(例如,激酶信号传导抑制剂)。在其它实施方案中,NGF 拮抗剂抑制(减少)NGF 合成和 / 或释放。在另一实施方案中,NGF 拮抗剂是非 TrkA 免疫粘合素的 NGF 拮抗剂(即,不是 TrkA 免疫粘合素)。在另一实施方案中,NGF 拮抗剂不是抗 NGF 抗体。在其它实施方案中,NGF 拮抗剂不是 TrkA 免疫粘合素并且不是抗 NGF 抗体。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂结合 NGF(诸如 hNGF)且不显著性结合相关神经营养蛋白,诸如 NT-3, NT4/5,和 / 或 BDNF。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂选自以下一种或多种:抗 NGF 抗体,针对 NGF 的反义分子(包括针对编码 NGF 的核酸的反义分子),针对 NGF 受体(诸如 trkA 和 / 或 p75)的反义分子(包括针对编码 NGF 受体的核酸的反义分子),NGF 抑制性化合物,NGF 结构类似物,与 NGF 结合的 TrkA 和 / 或 p75 受体的显性失活突变体,抗 TrkA 抗体,抗 p75 抗体,和激酶抑制剂。在另一实施方案中,NGF 拮抗剂是抗 NGF 抗体。而在其它实施方案中,抗 NGF 抗体是人源化的(诸如本文所述的抗体 E3)。在某些实施方案中,抗 NGF 抗体是抗体 E3(如本文所述)。在其它实施方案中,抗 NGF 抗体包含抗体 E3 的一个或多个 CDR(s)(诸如一个、两个、三个、四个、五个,或在有些情况下所有六个来自 E3 的 CDRs)。在其它实施方案中,抗体是人的。而在其它实施方案中,抗 NGF 抗体包含表 1 中所示重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)和表

2 中所示轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。而在其它实施方案中,抗体包含修饰的恒定区,诸如免疫上惰性的恒定区,例如,该恒定区不能触发补体介导的裂解,或不能刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。在其它实施方案中,恒定区按照 Eur. J. Immunol. (1999) 29 :2613-2624 ;PCT 申请序号 PCT/GB99/01441 ;和 / 或 UK 专利申请序号 9809951.8 中所述进行修饰。

[0032] 在某些实施方案中,NGF 拮抗剂结合 NGF。而在其它实施方案中,NGF 拮抗剂是特异性结合 NGF (诸如人 NGF) 的抗体。而在其它实施方案中,所述抗体与选自 Mab 911, MAb 912 和 MAb 938 的一种或多种小鼠单克隆抗体结合基本上相同的 NGF 表位 6 (参见 Hongo 等, Hybridoma 19 :215-227 (2000))。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂结合 trkA 受体。NGF 拮抗剂可以是抗人 NGF (抗 hNGF) 单克隆抗体,其能结合 hNGF 并有效地抑制 hNGF 与人 TrkA (hTrkA) 的结合和 / 或有效地抑制人 TrkA 受体的活化。

[0033] 抗 NGF 抗体对 NGF (诸如 hNGF) 的结合亲和力可以是约 0.10 至约 1.0nM、约 0.10nM 至约 0.80nM、约 0.15 至约 0.75nM 和约 0.18 至约 0.72nM。而一个实施方案中,结合亲和力为约 2pM-22pM。在某些实施方案中,结合亲和力为约 10nM。在其它实施方案中,结合亲和力小于约 10nM。在其它实施方案中,结合亲和力为约 0.1nM 或约 0.07nM。在其它实施方案中,结合亲和力小于约 0.1nM,或小于约 0.07nM。在其它实施方案中,结合亲和力为约 100nM、约 50nM、约 10nM、约 1nM、约 500pM、约 100pM 和约 50pM 中的任一项至约 2pM、约 5pM、约 10pM、约 15pM、约 20pM 和约 40pM 中的任一项。在某些实施方案中,结合亲和力为约 100nM、约 50nM、约 10nM、约 1nM、约 500pM、约 100pM,或约 50pM,或小于约 50pM。在某些实施方案中,结合亲和力小于约 100nM、约 50nM、约 10nM、约 1nM、约 500pM、约 100pM,或约 50pM。而在其它实施方案中,结合亲和力为约 2pM、约 5pM、约 10pM、约 15pM、约 20pM、约 40pM,或大于约 40pM。如本领域众所周知的,结合亲和力可用 K_D ,或解离常数进行表示,结合亲和力增加相应于 K_D 降低。抗 NGF 小鼠单克隆抗体 911 (Hongo 等, Hybridoma 19 :215-227 (2000)) 对人 NGF 的结合亲和力为约 10nM,而人源化抗 NGF 抗体 E3 (本文所述) 对人 NGF 的结合亲和力为约 0.07nM。

[0034] NGF 拮抗剂可以在导致或相关于手术疼痛的手术、切割和 / 或创伤之前、期间和 / 或之后进行施用。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂在手术、切割和 / 或创伤之前进行施用。NGF 拮抗剂的施用可以采取本领域已知的任何方法,包括:口服、静脉内、皮下、动脉内、肌肉内、心内、脊柱内、胸内、腹膜内、心室内、舌下和 / 或透皮。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂是抗 NGF 抗体,且施用通过一种或多种以下方法进行:静脉内、皮下、借助吸入、动脉内、肌肉内、心内、心室内和腹膜内。施用可以是全身性的,例如静脉内,或局部的。

[0035] 在某些实施方案中,NGF 拮抗剂的施用剂量是约 0.1-10mg/kg 体重,而在其它实施方案中,NGF 拮抗剂的施用剂量是约 0.3-2.0mg/kg 体重。

[0036] 另一方面,本发明公开了治疗和 / 或预防手术后疼痛的组合物,其包括有效量的神经生长因子 (NGF) 拮抗剂与一种或多种药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂是特异性结合 NGF 分子的抗体。在其它实施方案中,NGF 拮抗剂是本文所述的任何拮抗剂。

[0037] 另一方面,本发明公开了用于本文所述任何方法的试剂盒。在某些实施方案中,该试剂盒包括本文所述的任何 NGF 拮抗剂与药学上可接受的载体的组合。在其它实施方案

中,该试剂盒进一步包括在本文所述的任何方法中使用 NGF 拮抗剂的说明书。

[0038] 附图简述

[0039] 图 1 描述了在手术前 24 小时 (“基线”),手术后 2 小时 (“手术后”)和手术后 1 和 2 日评估的累积静止痛。“对照”是指无抗 NGF 抗体治疗,而“911”是指用 35mg/kg 抗 NGF 抗体 911 (也称为“Mab 911”)进行治疗的动物。Hongo 等,Hybridoma 19 :215-227 (2000)。采用抗 NGF 抗体的治疗显著降低了手术后静止痛。

[0040] 图 2 描述了在手术前 24 小时 (“基线”),手术后 4 小时 (“手术后”)和手术后 1 和 2 日评估的热痛 (痛觉过敏)。“对照”是指无抗 NGF 抗体治疗,而“911”是指用 35mg/kg 抗 NGF 抗体 911 进行治疗的动物。采用抗 NGF 抗体的治疗显著降低手术后热痛觉过敏。

[0041] 图 3 描述了在手术前 24 小时 (“基线”),手术后 3 小时 (“手术后”)和手术后 1, 2 和 3 日评估的响应机械性刺激的机械性疼痛 (痛觉过敏)。“对照”是指无抗 NGF 抗体治疗,而“911”是指用抗 NGF 抗体 911 进行治疗的动物。采用 7mg/kg 抗 NGF 抗体的治疗降低了手术后机械诱导的疼痛。

[0042] 图 4 描述了在手术后 24 小时评估的静止痛,其中显示出采用 0.02mg/kg,0.1mg/kg,0.6mg/kg 或 1mg/kg 人源化抗 NGF 抗体 E3 的治疗降低了疼痛。“*”表示与阴性对照的统计学上的显著性差异 ($p < 0.5$)。

[0043] 图 5 描述了在手术后 24 小时评估的静止痛,其中显示出,当在手术后两小时注射时,采用 0.5mg/kg 人源化抗 NGF 抗体 E3 的治疗显著性 ($p < 0.005$) 降低了静止痛。

[0044] 图 6 描述了在手术后 24 小时评估的静止痛,其中显示出,当在手术前 14 天注射时,采用 5mg/kg 抗 NGF 抗体 911 的治疗显著性降低了静止痛 ($p < 0.02$)。

[0045] 图 7 描述了在手术后 24 小时评估的静止痛,其中显示出,当在手术前 21 天注射时,采用 5mg/kg 抗 NGF 抗体 911 的治疗降低了静止痛。

[0046] 图 8 描述了切割以及用盐水、1mg/kg 抗 NGF 抗体 911 或阳性对照酮洛来克 (ketorolac) 处理后所呈现的完整伤口的比例。用抗 NGF 抗体 911 处理后完整伤口的比例与用盐水处理 (阴性对照) 后完整伤口的比例没有不同。因此,采用抗 NGF 抗体的治疗显示出对伤口愈合没有作用。与之相比,用 NSAID 酮洛来克治疗的动物 (阳性对照) 表现出完整伤口的比例显著降低。

[0047] 图 9 描述了用小分子 NGF 拮抗剂, K252a, 显著地 ($p < 0.005$) 降低了手术后的静止痛 (在 K252a 治疗后 3 小时 (“3H-P-tmt”) 进行评估)。“1H-P-tmt”是指 K525a 治疗后 1 小时。

[0048] 图 10 描述了用抗 NGF 抗体 (911) 的治疗与用同种型匹配的对照抗体的治疗的比较。用 1mg/kg 抗 NGF 抗体 (911) 治疗的动物表现出显著降低的静止痛 ($p < 0.05$)。与之对比,用 1mg/kg 针对果蝇 amnesiac 蛋白的同种型匹配的对照抗体治疗,表现出正常水平的静止痛。该试验说明抗 NGF 抗体的镇痛作用是特异性的。

[0049] 发明详述

[0050] 本发明基于如下发现,体内施用治疗上有效量的 NGF 拮抗剂诸如抗 NGF 单克隆抗体可用于预防和 / 或治疗手术后疼痛。先前,手术后疼痛采用高剂量的阿片类镇痛剂进行治疗。这些药剂会导致不良副作用诸如胃能动性降低、镇静作用、呼吸抑制和肾绞痛。其它疼痛药剂,诸如 NSAIDs,在治疗该类疼痛中也相对未成功,而且,某些 NSAIDs 已知会抑制创

伤愈合。

[0051] 本发明涉及通过施用有效量的 NGF 拮抗剂诸如抗 NGF 抗体,例如抗人 NGF(抗 hNGF)单克隆抗体来预防或治疗个体(包括哺乳动物,人和非人)中手术后疼痛的方法。

[0052] 另一方面,本发明提供了改善、延缓手术后疼痛的发生和/或防止手术后疼痛进展的方法,所述方法包括对个体施用有效量的 NGF 拮抗剂。

[0053] 在某些实施方案中,抑制、改善和/或预防静止痛,而在某些实施方案中,抑制、改善和/或预防机械性诱导的疼痛(例如,由运动或其它机械性或触觉刺激导致的疼痛),而在某些实施方案中,抑制、改善和/或预防热引起的疼痛。在某些实施方案中,通过施用抗 NGF 抗体抑制、改善和/或预防机械性诱导的疼痛。在某些实施方案中,通过施用抗 NGF 抗体抑制、改善和/或预防静止痛。

[0054] 在某些实施方案中,通过施用抗 NGF 抗体抑制、改善和/或预防热引起的疼痛。在某些实施方案中,抑制、改善和/或预防异常性疼痛,而在某些实施方案中,抑制、改善和/或预防痛觉过敏。而在其它实施方案中,异常性疼痛和/或痛觉过敏具有热或机械(触觉)特性,或是静止痛。在某些实施方案中,所述疼痛是慢性疼痛。在其它实施方案中,所述疼痛位于、邻近和/或接近一个或多个切割、伤口和/或创伤位点。

[0055] 本发明还涉及本文所述任一方法可使用的、用于治疗手术后疼痛的组合物和试剂盒,其包括 NGF 拮抗剂诸如抗 NGF 抗体,例如抗 NGF 单克隆抗体。在某些实施方案中,抗 NGF 抗体能有效抑制 NGF 与其 TrkA 和/或 p75 受体的结合和/或能够有效抑制 NGF 激活其 TrkA 和/或 p75 受体。

[0056] 一般技术

[0057] 实施本发明采用(除非另有指明)分子生物学(包括重组技术),微生物学,细胞生物学,生物化学和免疫学的常规技术,其均为本领域的已知技术。所述技术在本领域中已得到充分的描述,诸如, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition(Sambrook, 等, 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook(J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture(R. I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture(J. P. Mather 和 P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures(A. Doyle, J. B. Griffiths, 和 D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology(D. M. Weir 和 C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J. M. Miller 和 M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology(F. M. Ausubel, 等, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, 等, eds., 1994); Current Protocols in Immunology(J. E. Coligan 等, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons, 1999); Immunobiology(C. A. Janeway 和 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 和 C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual(E. Harlow 和 D. Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The

Antibodies (M. Zanetti 和 J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)。

[0058] 定义

[0059] “抗体”(与复数形式互换使用)是能够通过至少一个抗原识别位点而特异性结合靶诸如糖、多核苷酸、脂质、多肽等的免疫球蛋白分子,所述抗原识别位点位于免疫球蛋白分子的可变区内。如本文所使用的,该术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,还包括其片段(诸如 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv)、单链 (ScFv)、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、双体 (diabodies) 线性抗体、单链抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和包含具有所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其它修饰的构型。抗体包括任何类型的抗体,诸如 IgG、IgA 或 IgM(或其亚类),所述抗体无须是任何特定类型。根据抗体重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可被分为不同的类型。免疫球蛋白主要有五个类型: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,而其中某些还可进一步分为亚型(同种型),例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。与不同类型免疫球蛋白相对应 的重链恒定区被分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类型的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0060] “单克隆抗体”是指均质抗体群,其中单克隆抗体由抗原的选择性结合所涉及的氨基酸(天然存在的和非天然存在的)组成。单克隆抗体群具有高度特异性,针对单一的抗原位点。术语“单克隆抗体”不仅包括完整单克隆抗体和全长单克隆抗体,还包括其片段(诸如 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv),单链 (ScFv),其突变体,包含抗体部分的融合蛋白质,人源化单克隆抗体,嵌合单克隆抗体和包含具有所需特异性的抗原识别位点并能够结合抗原的免疫球蛋白分子的任何其它修饰构型。这不意在限制抗体的来源和制备其的方式(例如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等)。

[0061] “人源化”抗体是指具有基本上源于非人类物种的免疫球蛋白的抗原结合位点的分子,该分子的剩余免疫球蛋白结构基于人类免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点可以包括融合至恒定区的完整可变区或被移植至可变区中适宜构架区上的仅仅互补决定区(CDRs)。抗原结合位点可以是野生型的或通过一个或多个氨基酸置换而修饰的,例如,被修饰以便更近似于人类免疫球蛋白。某些形式的人源化抗体保留了所有 CDR 序列(例如,包含来自小鼠抗体的所有六个 CDRs 的人源化小鼠抗体)。其它形式的人源化抗体相对于原始抗体具有一个或多个改变的 CDRs(一个、两个、三个、四个、五个、六个)。在某些情况下,人类免疫球蛋白的构架区(FR)残基或其它残基被相应的非人类残基置换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体和供体抗体中未见的残基。

[0062] 本文所使用的术语“神经生长因子”和“NGF”是指神经生长因子和其保留了至少部分 NGF 活性的变体。如本文所使用的,NGF 包括所有哺乳动物物种的天然序列 NGF,包括人类、犬、猫、马或牛的。

[0063] “NGF 受体”是指由 NGF 结合或激活的多肽。NGF 受体包括任何哺乳动物物种的 TrkA 受体和 p75 受体,所述哺乳动物物种包括(但不限于)人、犬、猫、马、灵长类或牛。

[0064] “NGF 拮抗剂”是指可阻滞、抑制或降低(包括显著性地)NGF 生物活性(包括由 NGF 信号传导介导的下游通路,诸如受体结合和/或诱导针对 NGF 的细胞反应)的任何分子。术语“拮抗剂”并非意在任何具体的生物作用机制,应理解其清楚地包括和包含所有可能的与 NGF 的药理学、生理学和生物化学相互作用(无论是直接的还是间接的、或无论是与

NGF、其受体的相互作用还是通过另一机制的相互作用)及其结果(可通过多种不同的且化学上相异的组合物实现)。示例性 NGF 拮抗剂包括,但不限于,抗 NGF 抗体、针对 NGF 的反义分子(包括针对编码 NGF 的核酸的反义分子),NGF 抑制性化合物,NGF 结构类似物,与 NGF 结合的 TrkA 受体的显性失活突变体,TrkA 免疫粘合素,抗 TrkA 抗体,抗 p75 抗体,和激酶抑制剂。为了本发明的目的,应当明确地认识到术语“拮抗剂”包括所有先前鉴别的、可导致 NGF 自身,NGF 生物活性(包括但不限于其介导手术后疼痛的任何方面的能力)或该生物活性的结果以任何有意义的程度被实质上终止、降低或中和的术语、名称和功能状态及特征。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂(例如,抗体)结合(物理上相互作用于)NGF,结合 NGF 受体(诸如 trkA 受体和/或 p75 受体),和/或降低(阻碍和/或阻滞)下游 NGF 受体信号传导,和/或抑制(降低)NGF 合成、生成或释放。在其它实施方案中,NGF 拮抗剂结合 NGF 并防止 TrkA 受体二聚化和/或 TrkA 自磷酸化。在其它实施方案中,NGF 拮抗剂抑制或降低 NGF 合成和/或生成(释放)。本文中提供了各种 NGF 拮抗剂的实例。

[0065] 本文所使用的“抗 NGF 抗体”是指一种抗体,其能够结合 NGF 和抑制 NGF 生物活性和/或由 NGF 信号传导介导的下游通路。

[0066] “TrkA 免疫粘合素”是指包含 TrkA 受体片段和免疫球蛋白序列的可溶性嵌合分子,所述片段例如是 TrkA 受体的胞外域,该分子保留了 TrkA 受体的结合特异性。

[0067] NGF 的“生物活性”通常是指结合 NGF 受体和/或激活 NGF 受体信号通路的能力。并非意在限制,生物活性包括以下的任一项或多项:结合 NGF 受体(诸如 p75 和/或 TrkA)的能力;促进 TrkA 受体二聚化和/或自磷酸化的能力;激活 NGF 受体信号通路的能力;促进细胞分化、增殖、生存、生长及其它细胞生理学改变的能力,所述改变包括(在神经元(包括外周和中枢神经元)的情况下)在神经元形态学、突触发生、突触功能、神经递质和/或神经肽释放和损伤后再生方面的改变;和介导手术后疼痛的能力。

[0068] 术语“表位”意指蛋白质抗原上抗体(单克隆或多克隆抗体)的结合位点。

[0069] 本文所使用的“治疗”是获得有益的或需要的临床结果的方法。为了本发明的目的,有益的或需要的临床结果包括(但不限于)以下一项或多项:疼痛任何方面的改善,包括减轻严重度;缓解与手术后疼痛相关的一种或多种症状,包括手术后疼痛的任何方面(诸如静止痛和/或机械性诱导疼痛,疼痛持续期缩短和/或降低疼痛敏感性或感觉)。

[0070] “有效量”是足以产生有益的或需要的临床结果的量,所述结果包括疼痛的缓解或减轻。为了本发明的目的,NGF 拮抗剂的有效量是足以治疗、改善、减轻手术后疼痛强度或防止手术后疼痛的量。

[0071] 在某些实施方案中,“有效量”可减少静止时疼痛(静止痛)或机械性诱导的疼痛(包括运动后的疼痛),或二者兼有,且其可在切开、切割、撕裂或损伤之前、期间和/或之后进行施用。在某些实施方案中,“有效量”是足以延迟手术后疼痛发生的量。

[0072] 疼痛的“发生率降低”是指对严重度(其可包括降低了对通常用于治疗该病症的其它药物和/或疗法,包括例如,阿片剂的需要和/或量(例如,暴露量))、持续时间和/或频率(包括例如,在个体中延迟手术后疼痛的发生或增加术后疼痛发生前的时间)的任何降低。本领域技术人员应能理解,个体对治疗的反应会有不同,因此,例如“降低个体中手术后疼痛发生率的方法”反映的是基于如下合理预期而施用本文所述的 NGF 拮抗剂,所述预期为所述施用可能会在特定个体中导致术后疼痛发生率降低。

[0073] 手术后疼痛或手术后疼痛的一种或多种症状的“改善”是指与未施用 NGF 拮抗剂相比,手术后疼痛的一种或多种症状的减轻或改善。“改善”还包括缩短或减少症状的持续时间。

[0074] 手术后疼痛或手术后疼痛的一种或多种症状的“缓解”是指在用 NGF 拮抗剂根据本发明进行治疗的个体或个体群中,减轻手术后疼痛的一种或多种不良临床表现的程度。

[0075] 如本文所使用的,“延迟”手术后疼痛的发展是指延迟、阻碍、减缓、延缓、稳定和 / 或推迟手术后疼痛的进展。该延迟可以是各种长度的时间,这要根据病史和 / 或要治疗的个体而定。对于本领域技术人员很清楚的是,实际上,充分或显著的延迟包括预防,其中个体不会发生手术后疼痛。“延迟”症状发展的方法是指该方法与未使用该方法相比,能够降低给定时间期限内症状发展的可能性和 / 或减轻给定时间期限内症状的程度。所述比较典型地采用统计学显著性数目的受试者基于临床研究进行。

[0076] 手术后疼痛的“发展”或“进展”是指病症的最初显现和 / 或接着发生的进展。手术后疼痛的发展可采用本领域众所周知的标准临床技术进行检测和评估。然而,发展还指无法检测到的进展。为了本发明的目的,发展或进展是指症状的生物学过程。“发展”包括病状出现 (occurrence)、复发和发作。本文所使用的手术后疼痛的“发作”或“出现”包括初次发作和 / 或复发。

[0077] “个体”是脊椎动物,优选哺乳动物,更优选为人。哺乳动物包括 (但不限于) 农用动物、运动用动物、宠物、灵长类、马、犬、猫、小鼠和大鼠。

[0078] “手术后疼痛”(可与术语“切割后”或“创伤后疼痛”互换)是指由深入个体组织中的外伤,诸如切割、刺伤、切开、撕裂或损伤,引起或导致的疼痛(包括由所有手术过程(无论是侵入性的或是非侵入性的)导致的疼痛)。本文所使用的“手术后疼痛”不包括无外部物理创伤而出现的疼痛。在某些实施方案中,手术后疼痛为内部或外部的疼痛,而损伤、切割、创伤、撕裂或切口的发生可以是偶然的(例如伴随创伤)或有意的(例如伴随手术切割)。本文所使用的“疼痛”包括伤害感受和疼痛感觉,而疼痛可采用疼痛评分以及本领域其它众所周知的方法进行客观和主观的评估。本文所述的手术后疼痛包括异常性疼痛(即,对正常非有害刺激的反应增强),和痛觉过敏(即,对正常有害刺激或不适刺激的反应增强),其又可能具有热 或机械性(触觉的)性质。在一些实施方案中,疼痛具有热敏感性、机械敏感性和 / 或静止痛的特征。在某些实施方案中,手术后疼痛包括机械性诱导的疼痛或静止痛。在其它实施方案中,手术后疼痛包括静止痛。如本领域所众所周知的,疼痛可以是原发或继发疼痛。

[0079] “静止痛”是指与例如,个体运动时或被施加了其它机械性刺激(例如,戳或刺)时发生的疼痛相对的,甚至在个体静止时也发生的疼痛。

[0080] “机械性诱导的疼痛”(与术语“机械性感觉疼痛”可互换)是指由机械性刺激,诸如对表面施加重力、触觉刺激和由运动(包括咳嗽,提起重物等)导致或由与之相关的刺激引起的疼痛。

[0081] 当手术、创伤或损伤的恢复的一个方面被改善时(与不施用 NGF 拮抗剂时手术、创伤或损伤的恢复相比),手术、创伤或损伤的恢复被“增强”。例如,不需要的副作用(诸如与常规镇痛药(例如阿片样物质)的施用相关的副作用)的存在和 / 或强度在存在 NGF 拮抗剂时,相对于不存在 NGF 拮抗剂时,可被降低和 / 或消除。该增强通过施用 NGF 拮抗剂而

得以显现,其并不意味着必须针对任何给定个体实施和证实所述比较(施用 NGF 拮抗剂相对于未施用)。

[0082] 本发明的方法

[0083] 关于本文所述的所有方法,涉及 NGF 拮抗剂的内容还包括包含一种或多种这种药剂的组合物。这些组合物可进一步包括本领域众所周知的适宜赋形剂,诸如药学上可接受的赋形剂(载体),包括缓冲液。本发明可单独和与其它常规治疗方法联合使用。

[0084] 预防或治疗手术后疼痛的方法

[0085] 本发明可用于在个体中治疗、延迟和/或预防手术后疼痛的发展,所述个体包括所有的哺乳动物,人类和非人类。此外,本发明可用于具有无论是切割伤、穿刺伤还是撕裂伤的组织切割性损伤(无论是内部还是外部)的个体中。所述切割性损伤可以是伴有创伤的偶然发生,或可以是由于手术的有意发生。

[0086] 由此,本发明的一个方面是提供治疗个体中手术后疼痛的方法,包括施用有效量的 NGF 拮抗剂,诸如抗 NGF 抗体。在某些实施方案中,手术后疼痛包括以下一项或多项:异常性疼痛、痛觉过敏、机械性诱导的疼痛、热引起的疼痛、机械导致的疼痛或静止痛。在某些实施方案中,手术后疼痛包括机械性诱导的疼痛和/或静止痛。我们已经观测到,例如,抗 NGF 抗体可缓解这两种情况。在其它实施方案中,手术后疼痛包括静止痛。疼痛可以是原发和/或继发的疼痛。

[0087] 在其它实施方案中,抑制、改善和/或预防异常性疼痛,而在某些实施方案中,抑制、改善和/或预防痛觉过敏。在其它实施方案中,异常性疼痛和/或痛觉过敏具有热或机械(触觉)特性(或两者),或是静止痛。在某些实施方案中,所述疼痛是慢性疼痛。在其它实施方案中,所述疼痛位于、邻近或接近一个或多个切割、伤口和/或创伤位点。

[0088] 另一方面,本发明提供了预防、改善和/或防止手术后疼痛的发展或进展的方法。

[0089] 在某些实施方案中,在手术前(在某些实施方案中,在可能导致外部创伤和/或伤口的行为之前)施用 NGF 拮抗剂(诸如抗 NGF 抗体)。例如,可在具有发生创伤、伤口或切割风险的行为之前或在手术(在某些实施方案中,可能导致创伤、伤口或切割)之前 30 分钟、1 小时、5 小时、10 小时、15 小时、24 小时或更长时间,诸如 1 日,几日甚或 1 周、2 周、3 周或更长时间施用 NGF 拮抗剂。在其它实施方案中,在手术或可能导致外部创伤或伤口的行为期间和/或之后施用 NGF 拮抗剂。而一个实施方案中,在手术、损伤或创伤之后 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、6 小时、8 小时、12 小时、24 小时、30 小时、36 小时或更长时间施用 NGF 拮抗剂。

[0090] 另一方面,本发明提供了增加疼痛阈值的方法。本文所用的“增加疼痛阈值”是指对与手术、切割、伤口或创伤相关的疼痛的降低、减小和/或最小化(包括主观疼痛知觉的降低、减少和/或最小化)。

[0091] 而另一方面,本发明提供了增强手术恢复的方法(以及提高自损伤、创伤和/或切割恢复的方法)。

[0092] 应当认识到,虽然此处一般性提及治疗或预防手术后疼痛,但 NGF 拮抗剂可在具有引起外部创伤(诸如撞击)、损伤或伤口的增高风险的事件或状态之前进行施用。本领域技术人员应能理解,具有引起外部创伤、损伤或伤口的增高风险的事件或状态包括危险性职业、搏斗和/或运动行为。

[0093] 疼痛的诊断或评估是本领域众所周知的。评估可根据客观检测,诸如观测行为诸如对刺激的反应,面部表情等来实施。评估还可根据主观检测,诸如患者对疼痛的特征描述,采用各种疼痛等级来进行。参见例如,Katz 等,Surg Clin North Am. (1999) 79(2) : 231-52 ;Caraceni 等,J Pain Symptom Manage(2002) 23(3) :239-55。

[0094] 疼痛缓减还可通过缓减的时程进行表征。由此,在某些实施方案中,在1、2或几个小时(而在某些实施方案中,峰值在约12-18小时)之后在主观或客观上观察疼痛缓减。在另一实施方案中,在手术后(或与伤口或创伤相关的事件)后24、36、48、60、72或更多小时在主观或客观上观察疼痛缓减。

[0095] NGF 拮抗剂

[0096] 本发明的方法使用NGF拮抗剂,其是指能够阻滞、抑制或降低(包括显著性地)NGF生物活性(包括由NGF信号传导介导的下游通路,诸如受体结合和/或引起对NGF的细胞反应)的任何分子。术语“拮抗剂”并非意在任何具体的生物活性机制,而且应当认为其明确包括和包含所有可能的与NGF的药理学、生理学和生物化学相互作用及其结果,这可通过各种不同的,且化学趋异的组合物实现。示例性NGF拮抗剂包括,但不限于,抗NGF抗体,针对NGF的反义分子(包括针对编码NGF的核酸的反义分子),针对NGF受体(诸如trkA受体和/或p75受体)的反义分子(包括针对编码TrkA和/或p75的核酸的反义分子),NGF抑制性化合物,NGF结构类似物,与NGF结合的TrkA受体的显性失活突变体,TrkA免疫粘合素,抗TrkA抗体,抗p75抗体,和激酶抑制剂。为了本发明的目的,应当明确地认识到术语“拮抗剂”包括所有先前鉴别的术语、名称和功能状态和特性,它们可以引起NGF自身、NGF生物活性(包括但不限于NGF介导手术后疼痛之任何方面的能力)或该生物活性的结果以任何有意义的程度被实质上无效、降低或中和。在某些实施方案中,NGF拮抗剂(例如,抗体)结合(物理上相互作用于)NGF,结合NGF受体(诸如trkA受体和/或p75受体),和/或降低(阻碍和/或阻滞)下游NGF受体信号。由此,在某些实施方案中,NGF拮抗剂结合(物理上相互作用于)NGF。在其它实施方案中,NGF拮抗剂结合NGF受体(诸如TrkA受体和/或p75)。在其它实施方案中,NGF拮抗剂降低(阻碍和/或阻滞)下游NGF受体信号(例如,激酶信号的抑制剂)。在其它实施方案中,NGF拮抗剂抑制(减少)NGF合成和/或释放。在另一实施方案中,NGF拮抗剂是非TrkA免疫粘合素的NGF拮抗剂(即,排除TrkA免疫粘合素)。在另一实施方案中,NGF拮抗剂不是抗NGF抗体。在其它实施方案中,NGF拮抗剂不是TrkA免疫粘合素也不是抗NGF抗体。在某些实施方案中,NGF拮抗剂结合NGF(诸如hNGF)且不显著性结合相关神经营养蛋白,诸如NT-3,NT4/5,和/或BDNF。在某些实施方案中,NGF拮抗剂不与不良免疫反应相关。在其它实施方案中,NGF拮抗剂是抗NGF抗体。而在其它实施方案中,抗NGF抗体是人源化的(诸如本文所述的抗体E3)。在某些实施方案中,抗NGF抗体是抗体E3(如本文所述)。在其它实施方案中,抗NGF抗体包括抗体E3的一个或多个CDR(s)(诸如一个、两个、三个、四个、五个,或在一些情况下所有六个来自E3的CDRs)。在其它实施方案中,抗体是人的。而在其它实施方案中,抗NGF抗体包括表1中所示重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)和表2中所示轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。而在其它实施方案中,抗体包括修饰的恒定区,诸如免疫学上惰性的恒定区,例如,该恒定区不能触发补体介导的细胞裂解,或不能刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在其它实施方案中,恒定区按照Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624;

PCT 申请序号 PCT/GB99/01441 ;和 / 或 UK 专利申请序号 9809951.8 中所述进行修饰。

[0097] 抗 NGF 抗体

[0098] 在本发明的某些实施方案中, NGF 拮抗剂包括抗 NGF 抗体。抗 NGF 抗体应表现出以下任何一种或多种特征: (a) 结合 NGF; (b) 抑制 NGF 生物活性或由 NGF 信号功能介导的下游通路; (c) 预防、改善或治疗手术后疼痛的任何方面; (d) 阻滞或降低 NGF 受体活化(包括 TrkA 受体二聚化和 / 或自磷酸化); (e) 增加 NGF 的清除; (f) 抑制(减少) NGF 合成、生成或释放; (g) 增强手术、伤口或创伤的恢复。

[0099] 抗 NGF 抗体是本领域已知的, 参见例如, PCT 公开序号 W001/78698, WO 01/64247, 美国专利 5,844,092、5,877,016 和 6,153,189; Hongo 等, Hybridoma, 19:215-227 (2000); Cell. Molec. Biol. 13:559-568 (1993); GenBank 登记序号 U39608、U39609、LI 7078 或 L17077。

[0100] 在某些实施方案中, 抗 NGF 抗体是命名为抗体“E3”的人源化小鼠抗 NGF 单克隆抗体, 其包括人类重链 IgG2a 恒定区(其中包含以下突变: A330P331 至 S330S331(氨基酸编号参照野生型 IgG2a 序列; 参见 Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624)); 人类轻链 κ 恒定区; 以及表 1 和 2 所示的重链和轻链可变区。

[0101] 表 1: 重链可变区

[0102] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFYFDYWGQGLTVTS (SEQ ID NO:1)。

[0103] 表 2: 轻链可变区

[0104] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFDTFTISLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO:2)。

[0105] 编码重链可变区或轻链可变区的下列多核苷酸于 2003 年 1 月 8 日保藏于 ATCC。

[0106]

材料		ATCC 保藏号	保藏日期
载体 Eb. 911. 3E	E3 轻链 V 区	PTA-4893	2003 年 1 月 8 日
载体 Eb. pur. 911. 3E	E3 轻链 V 区	PTA-4894	2003 年 1 月 8 日
载体 Db. 911. 3E	E3 重链 V 区	PTA-4895	2003 年 1 月 8 日

[0107] 载体 Eb. 911. 3E 是编码表 2 中所示轻链可变区的多核苷酸; 载体 Eb. pur. 911. 3E 是编码表 2 中所示轻链可变区的多核苷酸而载体 Db. 911. 3E 是编码表 1 中所示重链可变区的多核苷酸。

[0108] 在另一实施方案中, 抗 NGF 抗体包括抗体 E3 的一个或多个 CDR(s) (诸如一个、两个、三个、四个、五个, 或在一些情况下所有六个来自 E3 的 CDRs)。确定 CDR 区是本领域中众所周知的技术。

[0109] 可用于本发明的抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段(例如, Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc 等)、嵌合抗体、双特异性抗体、杂缀合抗体(heteroconjugate antibody)、单链(ScFv)、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白质、人源化抗体和包含具有所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其它修饰的构型, 包括抗体的糖基化变体, 抗体的氨基酸序列变体和共价修饰的抗体。抗体可以是小鼠源、大鼠源、人源或任何其它来源的(包括嵌合的或人源化抗体)。为了本发明的目的, 抗体以抑制 NGF 和 / 或由 NGF 信号功能介导的下游通路的方式与 NGF 反应。而一个实施方案中, 抗体是人类抗体, 其识别

人类 NGF 上的一个或多个表位。在另一实施方案中,抗体是小鼠或大鼠抗体,其识别人类 NGF 上的一个或多个表位。在另一实施方案中,抗体识别选自以下的 NGF 上的一个或多个表位:灵长动物、犬、猫、马和牛的 NGF。在其它实施方案中,抗体包括修饰的恒定区,诸如免疫学上惰性的恒定区,例如,该恒定区不能触发补体介导的裂解,或不能刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。ADCC 活性可采用美国专利号 5,500,362 中所述方法进行评估。在其它实施方案中,恒定区按照 Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624;PCT 申请序号 PCT/GB99/01441;和 / 或 UK 专利申请序号 9809951.8 中所述进行修饰。

[0110] 抗 NGF 抗体对 NGF (诸如 hNGF) 的结合亲和力可以是约 0.10 至约 0.80nM、约 0.15 至约 0.75nM 和约 0.18 至约 0.72nM。而在一个实施方案中,结合亲和力为约 2pM-22pM。在某些实施方案中,结合亲和力为约 10nM。在其它实施方案中,结合亲和力小于约 10nM。在其它实施方案中,结合亲和力为约 0.1nM 或约 0.07nM。在其它实施方案中,结合亲和力小于约 0.1nM,或小于约 0.07nM。在其它实施方案中,结合亲和力为约 100nM、约 50nM、约 10nM、约 1nM、约 500pM、约 100pM 或约 50pM 之任一项至约 2pM、约 5pM、约 10pM、约 15pM、约 20pM 或约 40pM 之任一项。在某些实施方案中,结合亲和力为约 100nM、约 50nM、约 10nM、约 1nM、约 500pM、约 100pM 或约 50pM,或小于约 50pM。在某些实施方案中,结合亲和力小于约 100nM、约 50nM、约 10nM、约 1nM、约 500pM、约 100pM 或约 50pM。而在其它实施方案中,结合亲和力为约 2pM、约 5pM、约 10pM、约 15pM、约 20pM、约 40pM 或大于约 40pM。

[0111] 测定抗体对 NGF 的结合亲和力的一个方法是检测抗体的单功能性 Fab 片段的结合亲和力。为了获得单功能性 Fab 片段,可用木瓜蛋白酶酶切或重组表达抗体 (例如, IgG)。抗体的抗 NGF Fab 片段的亲和力可通过表面等离子共振 (BIAcore3000™ 表面等离子共振 (SPR) 系统, BIAcore, INC, Piscaway NJ) 进行测定。CM5 芯片可用 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 根据厂商说明书进行活化。人类 NGF (或任何其它 NGF) 可在 10mM 醋酸钠 pH 4.0 中稀释,并以 0.005mg/mL 的浓度注射到活化的芯片上。采用跨各芯片通道的变化流动时间,得到两个范围的抗原密度:用于详细动力学研究的 100-200 反应单位 (RU) 以及用于筛选试验的 500-600RU。该芯片可用乙醇胺封闭。再生研究显示, Pierce 洗脱缓冲液 (产品号 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) 和 4M NaCl (2:1) 的混合物经过注射 200 次以上,能有效地除去结合的 Fab,而在芯片上保留 hNGF 的活性。HBS-EP 缓冲液 (0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 表面活性剂 P29) 被用作 BIAcore 测定的运行缓冲液。纯化的 Fab 样品的连续稀释物 (0.1-10× 估计的 K_D) 以 100 μ L/分钟注射 1 分钟,允许多达 2h 的解离时间。Fab 蛋白质的浓度通过 ELISA 和 / 或 SDS-PAGE 电泳,采用已知浓度的 Fab (通过氨基酸分析测定的) 作为标准进行测定。通过采用 BIA 评估程序,将数据与 1:1 Langmuir 结合模型 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) 相拟合而同时得到动力学缔合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。以 k_{on}/k_{off} 计算平衡解离常数 (K_D) 值。该方案适用于测定抗体对任何物种 NGF 的结合亲和力,所述任何物种的 NGF 包括人类 NGF,其它脊椎动物的 NGF (在某些实施方案中,哺乳动物) (诸如小鼠 NGF、大鼠 NGF、灵长类 NGF),并且该方案也适用于与其它神经营养蛋白,诸如相关的神经营养蛋白 NT3, NT4/5 和 / 或 BDNF 一起使用。

[0112] 在某些实施方案中,抗体结合人类 NGF,而不显著性结合来自其它脊椎动物物种

(在某些实施方案中,哺乳动物)的 NGF。在某些实施方案中,抗体结合人类 NGF 以及来自其它脊椎动物物种(在某些实施方案中,哺乳动物)的一种或多种 NGF。而在其它实施方案中,抗体结合 NGF,且不显著性地与神经营养蛋白(诸如相关的神经营养蛋白,NT3,NT4/5 和 / 或 BDNF)发生交叉反应。在某些实施方案中,抗体结合 NGF 以及至少一种其它神经营养蛋白。在某些实施方案中,抗体结合哺乳动物物种的 NGF,诸如马或犬的,但不显著性结合来自其它哺乳动物物种的 NGF。

[0113] 表位可以是连续的或不连续的。而一个实施方案中,抗体与选自以下的抗体基本上结合相同的 hNGF 表位:MAb 911、MAb 912 和 MAb 938,如 Hongo 等,Hybridoma,19:215-227(2000)中所述。在另一实施方案中,抗体与 MAb 911 基本上结合相同的 hNGF 表位。而在另一实施方案中,抗体与 MAb 909 基本上结合相同的表位。Hongo 等,如上。例如,表位可包括以下之一或多个:hNGF 的可变区 1(氨基酸 23-35)中的残基 K32、K34 和 E35;hNGF 的可变区 4(氨基酸 81-88)中的残基 F79 和 T81;可变区 4 中的残基 H84 和 K88;hNGF 的可变区 5(氨基酸 94-98)和 hNGF 的 C 末端(氨基酸 111-118)之间的残基 R103;hNGF 的前可变区(pre-variable region)1(氨基酸 10-23)中的残基 E11;hNGF 的可变区 2(氨基酸 40-49)和 hNGF 的可变区 3(氨基酸 59-66)之间的 Y52;hNGF 的 C 末端中的残基 L112 和 S113;hNGF 的可变区 3 中的残基 R59 和 R69;或 hNGF 的前可变区 1 中的残基 V18、V20 和 G23。此外,表位可以包括 hNGF 的可变区 1,可变区 3,可变区 4,可变区 5,N 末端区和 / 或 C 末端区的一个或多个。而在另一实施方案中,抗体显著性降低 hNGF 的残基 R103 的溶剂可达性。应当理解,虽然上述表位涉及人类 NGF,但本领域技术人员能将人类 NGF 的结构和其它物种的 NGF 相比对,并鉴别这些表位的可能对应物。

[0114] 在一个方面中,能够抑制 NGF 的抗体(例如,人的,人源化的,小鼠的,嵌合的)可通过采用表达 NGF 的全长或部分序列的免疫原进行制备。另一方面,可使用包含过表达 NGF 的细胞的免疫原。可使用的免疫原的另一实例是包含全长 NGF 或 NGF 蛋白质的部分的 NGF 蛋白质。

[0115] 抗 NGF 抗体可通过本领域已知的任何方法制备。宿主动物免疫接种的途径和方案通常与用于抗体刺激和制备的成熟常规技术保持一致,如本文进一步所述的。制备人类和小鼠抗体的一般技术是本领域已知的,并已被本文公开。

[0116] 可以想到,任何哺乳动物受试者(包括人类)或来自其的产生抗体的细胞均可被操作以便作为制备哺乳动物(包括人类)杂交瘤细胞系的基础。典型地,用一定量的免疫原(包括如本文所述的)经腹膜内、肌内、口服、皮下、足底内和 / 或皮内接种宿主动物。

[0117] 杂交瘤可由淋巴细胞和永生化骨髓瘤细胞制备,其中采用 Kohler, B. 和 Milstein, C. (1975)Nature 256:495-497 的一般体细胞杂交技术或按 Buck, D. W. 等, In Vitro,18:377-381(1982)所修饰的技术。现有的骨髓瘤细胞系(包括但不限于 X63-Ag8.653 和来自 Salk Institute,Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA 的那些细胞系)可用于杂交。一般地,该技术包括采用促融剂诸如聚乙二醇,或通过本领域技术人员众所周知的电方法来融合骨髓瘤细胞和淋巴样细胞。融合后,从融合培养基中分离细胞然后在选择性生长培养基诸如次黄嘌呤-氨基喋呤-胸苷(HAT)培养基中生长,以清除未杂交的亲本细胞。本文所述任何培养基(添加或未添加血清)均可用于培养分泌单克隆抗体的杂交瘤。作为细胞融合技术的另一可选方式,由 EBV 永生化的 B 细胞可被用

于产生本发明的抗 NGF 单克隆抗体。将杂交瘤扩增并亚克隆,如有需要,然后通过常规免疫测定方法(例如,放射免疫测定、酶免疫分析法或荧光免疫分析)对上清液检测抗免疫原活性。

[0118] 可作为抗体来源的杂交瘤包括能够产生特异性针对 NGF 或其部分的单克隆抗体的亲本杂交瘤的所有衍生物、后代细胞。

[0119] 采用已知的方法可在体外或体内生长能产生所述抗体的杂交瘤。通过常规的免疫球蛋白纯化方法,诸如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、色谱法和超滤(如需要),可从培养基或体液中分离单克隆抗体。如果存在不需要的活性,可通过,例如,将制品过由附着于固相的免疫原制成的吸附剂和从免疫原上洗脱或释放所需抗体而将不需要的活性除去。采用人类 NGF 或包含靶氨基酸序列的片段(通过双功能性试剂或衍生化试剂,例如马来酰亚胺苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基的缀合),N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOC12 或 $R_1N = C = NR$ (其中 R 和 R_1 是不同的烷基基团)而与在要免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质(例如,匙孔虫戚血兰蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)缀合),免疫宿主动物,可产生抗体群(例如,单克隆抗体)。

[0120] 如有需要,可对感兴趣的抗 NGF 抗体(单克隆或多克隆)测序,然后将多核苷酸序列克隆至载体中来表达或增殖。编码目的抗体的序列可被保持于宿主细胞的载体中,然后可将宿主细胞扩增并冷冻备用。在可选的方式中,多核苷酸序列可被用于遗传操作以对抗体“人源化”或增强抗体的亲和力或抗体的其它特征。例如,如果抗体被用于人类临床试验和治疗,可以对恒定区进行工程化处理以便更加类似人类恒定区从而避免免疫反应。可能需要对抗体序列进行遗传操作以便获得对 NGF 更高的亲和力和抑制 NGF 的更高效能。对本领域技术人员来说很明显的是,可以对抗 NGF 抗体进行一个或多个多核苷酸的改变而仍保留其与 NGF 的结合能力。

[0121] 对单克隆抗体人源化有四个一般步骤。它们是:(1) 确定起始抗体轻和重可变区的核苷酸和预测的氨基酸序列(2) 设计人源化抗体,即,决定在人源化过程中使用何种抗体构架区(3) 实际的人源化方法学/技术和(4) 转染和表达人源化抗体。参见,例如,美国专利序号 4,816,567 ;5,807,715 ;5,866,692 ;6,331,415 ;5,530,101 ;5,693,761 ;5,693,762 ;5,585,089 和 6,180,370。

[0122] 包含来源于非人类免疫球蛋白的抗原结合位点的大量“人源化”抗体分子已被公开,包括具有与人类恒定区融合的啮齿类或修饰的啮齿类 V 区 and 其相关互补决定区(CDRs)的嵌合抗体。参见,例如, Winter 等, Nature 349 :293-299(1991), Lobuglio 等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86 :4220-4224(1989), Shaw 等, J Immunol. 138 :4534-4538(1987) 和 Brown 等, Cancer Res. 47 :3577-3583(1987)。其他参考文件公开了将啮齿类 CDRs 在与适宜的人类抗体恒定区融合前植入人类支持构架区(FR)中。参见,例如, Riechmann 等, Nature 332 :323-327(1988), Verhoeyen 等, Science 239 :1534-1536(1988) 和 Jones 等, Nature 321 :522-525(1986)。另一参考文件公开了由重组镶嵌的啮齿类构架区支持的啮齿类 CDRs。参见,例如,欧洲专利公开号 0519596。这些“人源化”分子的设计目的在于将针对啮齿类抗人抗体分子的不需要的免疫反应最小化,所述免疫反应限制了这些部分在人类受者中治疗应用的持续时间和功效。例如,抗体恒定区可被工程操作以便使其具有免疫

学惰性（例如，不能触发补体溶胞作用）。参见，例如 PCT 申请号 PCT/GB99/01441；UK 专利申请号 9809951.8。还可使用的抗体人源化的其它方法被公开于 Daugherty 等，Nucl. Acids Res. 19:2471-2476(1991) 和美国专利序号 6,180,377；6,054,297；5,997,867；5,866,692；6,210,671 和 6,350,861 和 PCT 公开序号 W001/27160 中。

[0123] 而在另一可选方式中，完全人类抗体可通过使用商业小鼠获得，所述小鼠已被工程操作以表达特异性人类免疫球蛋白。被设计为产生更需要的（例如，完全人类抗体）或更强的免疫反应的转基因动物也可用于生成人源化或人类抗体。所述方法的实例为 Abgenix 公司 (Fremont, CA) 的 Xenomouse™ 和 Medarex 公司 (Princeton, NJ) 的 HuMAb-Mouse® 和 TCMouse™。

[0124] 在一个可选方式中，抗体可采用本领域已知的任何方法重组地制备和表达。在另一可选方式中，抗体可通过噬菌体展示技术而重组地制备。参见，例如，美国专利序号 5,565,332；5,580,717；5,733,743 和 6,265,150；和 Winter 等，Annu. Rev. Immunol. 12:433-455(1994)。可选地，噬菌体展示技术 (McCafferty 等，Nature 348:552-553(1990)) 可被用于从来自未免疫供者的免疫球蛋白可变 (V) 区基因库中体外制备人类抗体和抗体片段。根据该技术，将抗体 V 区基因以符合读框方式克隆至丝状噬菌体诸如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因中，并以功能性抗体片段而展示在噬菌体颗粒的表面上。因为丝状噬菌体颗粒包括噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝，基于抗体功能特性的选择也导致选择出编码展示这些特性的抗体的基因。由此，噬菌体模拟了 B 细胞的某些特性。噬菌体展示可以以多种方式实施，综述参见例如，Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., Current opinion in Structural Biology 3,564-571(1993)。几种 V 基因区段来源可被用于噬菌体展示。Clackson 等，Nature 352:624-628(1991) 从来自免疫小鼠的脾的 V 基因的小随机组合文库中分离了多种抗 噁唑酮抗体。可构建来自未免疫人类供者的 V 基因库，而且基本上根据 Mark 等，J Mol. Biol. 222:581-597(1991) 或 Griffith 等，EMBO J. 12:725-734(1993) 所述技术可分离针对一系列不同抗原（包括自体抗原）的抗体。在天然免疫反应中，抗体基因以高速率累积突变（体细胞高变）。引入的某些改变将提供更高的亲和力，展示高亲和力表面免疫球蛋白的 B 细胞在随后抗原攻击期间被优先复制和分化。该天然过程可通过使用被称为“链改组” (chain shuffling) 的技术进行模拟，Marks, 等，Biol/Technol. 10:779-783(1992)。在该方法中，通过噬菌体展示得到的“初级”人类抗体的亲和力可通过随后用获自未免疫供者的 V 区基因天然变体库 (repertoires) 替换重和轻链 V 区基因而得以提高。该技术能够生产具有 pM-nM 范围亲和力的抗体和抗体片段。制备非常大的噬菌体抗体库的策略（也称为“the mother-of-all libraries”）已被公开于 Waterhouse 等，Nucl. Acids Res. 21:2265-2266(1993)。基因改组还可被用于从啮齿类抗体中衍生人类抗体，其中人类抗体具有与起始啮齿类抗体相似的亲和力和特异性。根据该方法（也被称为“表位印记” (epitope imprinting)），通过噬菌体展示技术得到的啮齿类抗体的重或轻链 V 区基因被人类 V 区基因库替换，产生啮齿类-人类嵌合体。在抗原上的选择导致分离能恢复功能性抗原结合位点的人类可变区，即，表位支配（印记）配偶体的选择。当重复该过程以便替换剩余的啮齿类 V 区时，得到人类抗体（参见 PCT 公开序号 W0 93/06213, 1993 年 4 月 1 日公布）。与通过 CDR 移植的啮齿类抗体传统人源化不同，该技术提供了完全的人类抗体，其不含有啮齿类来源的构架或 CDR 残基。

[0125] 显然,虽然上述内容涉及人源化抗体,但所述一般原则也适用于定制抗体在例如,犬、猫、灵长类、马和牛中使用。而且很显然地,本文所述的抗体人源化的一个或多个方面可进行联合,例如,CDR 移植,构架突变和 CDR 突变。

[0126] 抗体可通过如下方法重组制备,即首先从宿主动物中分离抗体和产生抗体的细胞,得到基因序列,和使用该基因序列以在宿主细胞(例如,CHO 细胞)中重组表达抗体。可使用的另一方法是在植物(例如,烟草)或转基因乳中表达抗体序列。在植物或乳中重组表达抗体的方法已被公开。参见,例如,Peeters 等, *Vaccine* 19:2756(2001);Lonberg, N. 和 D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13:65(1995) 和 Pollock, 等, *J Immunol Methods* 231:147(1999)。制备抗体衍生物,例如,人源化抗体、单链抗体等的方法是本领域已知的。

[0127] 免疫测定法和流式细胞分选技术诸如荧光激活细胞分选术(FACS)也可被用于分离特异性针对 NGF 的抗体。

[0128] 抗体可与多种不同的载体结合。载体可以是活性的和/或惰性的。众所周知的载体的实例包括聚丙烯、聚苯乙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉、酶、玻璃、天然和改性的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁石。根据本发明的目的,载体的性质可以是可溶的或不可溶的。本领域技术人员将能知晓用于结合抗体的其它适宜载体,或能够采用常规实验确定所述载体。

[0129] 采用常规技术(例如,通过采用能够特异性结合编码单克隆抗体的重和轻链的基因的寡核苷酸探针)可很容易地对编码单克隆抗体的 DNA 分离和测序。杂交瘤细胞是所述 DNA 的优选来源。一经分离,可将 DNA 置于表达载体中(诸如 PCT 公开序号 WO 87/04462 中公开的表达载体),然后将其转染至不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞诸如大肠杆菌细胞,猿 COS 细胞,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中,以便在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。参见例如, PCT 公开序号 WO 87/04462。DNA 还可通过如下方式进行修饰,例如,通过用人类重和轻链恒定区的编码序列替换同源鼠序列(Morrison 等, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851(1984))或通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分共价连接至免疫球蛋白的编码序列。以该方式,制备具有本文所述抗 NGF 单克隆抗体的结合特异性的“嵌合”或“杂合”抗体。

[0130] 抗 NGF 抗体可采用本领域众所周知的方法进行表征。例如,一种方法是鉴别其结合的表位,或“表位作图”。本领域中存在多种已知的用于蛋白质上表位的定位的作图和表征方法,包括解析抗体-抗原复合物的晶体结构,竞争测定法,基因片段表达测定法和基于合成肽的测定法,其被描述于,例如, Harlow 和 Lane, 抗体使用, 实验室手册 (Using Antibodies, a Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999 的第 11 章中。在其它实例中,表位作图可被用于测定抗 NGF 抗体所结合的序列。表位作图可获自多种商业来源,例如, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands)。表位可以是线性表位,即,包含在一段氨基酸序列中,或是由不一定包含在一段氨基酸序列中的多个氨基酸的三维相互作用形成的构象表位。可分离或合成(例如,重组地)具有各种长度的肽(例如,至少 4-6 个氨基酸长度),并与抗 NGF 抗体用于结合测定法。在另一实例中,抗 NGF 抗体所结合的表位可通过采用来自 NGF 序列的重叠肽和测定其与抗 NGF 抗体的结合而在系统筛选中得以确定。根据基因片段表达测定法,编码 NGF 的开放读码框被随机或由特异性遗传构建体进行片段化,然后测定

表达的 NGF 片段与要被检测的抗体的反应性。基因片段可通过,例如,PCR 进行制备,然后在存在放射性氨基酸的情况下,于体外转录和翻译为蛋白质。然后通过免疫沉淀和凝胶电泳测定抗体与放射性标记的 NGF 片段的结合。某些表位还可通过采用噬菌体颗粒表面上展示的大型随机肽序列文库(噬菌体文库)进行鉴别。可选地,由重叠肽片段组成的确定文库可被用在简单结合测定法中检测与试验抗体的结合。在其它实例中,可实施抗原结合域的诱变,域交换试验和丙氨酸扫描诱变以便鉴别对于实现表位结合而言需要的、足够的和/或必须的残基。例如,可采用突变 NGF 实施域交换试验,所述突变 NGF 中,NGF 多肽的不同片段已被来自非常相关的、但抗原性不同的蛋白质(诸如神经营养蛋白家族的其它成员)的序列替换(交换)。通过评估抗体对突变 NGF 的结合,可评估特定 NGF 片段对抗体结合的重要性。

[0131] 而可用于表征抗 NGF 抗体的另一方法是使用已知结合相同抗原(即,NGF 上的各种片段)的其它抗体的竞争测定法,以测定抗 NGF 抗体是否与其它抗体结合相同的表位。竞争测定法是本领域技术人员众所周知的。可用于本发明的竞争测定法的抗体的实例包括 MA911,912,938,如 Hongo 等,Hybridoma 19:215-227(2000)中所述。

[0132] 其它 NGF 拮抗剂

[0133] 可使用非抗 NGF 抗体的 NGF 拮抗剂。在本发明的某些实施方案中,NGF 拮抗剂包括至少一种能够阻滞或降低功能性 NGF 表达的反义分子。NGF 的核苷酸序列是已知的,可很容易地从公众可得到的数据库中获得。参见例如,Borsani 等,Nuc. Acids Res. 1990,18,4020;登录号 NM 002506;Ullrich 等,Nature 303:821-825(1983)。制备能够特异性结合 NGF mRNA 而不与其它多核苷酸发生交叉反应的反义寡核苷酸分子是常规的方法。靶向的实例性位点包括,但不限于,起始密码子,5' 调节区,编码序列和 3' 非翻译区。在某些实施方案中,寡核苷酸的长度为约 10-100 个核苷酸,长度为约 15-50 个核苷酸,长度为约 18-25 个核苷酸,或更多。寡核苷酸可包括本领域众所周知的主链修饰诸如,硫代磷酸酯键和 2' -O 糖修饰。示例性反义分子包括美国公开序号 20010046959 中公开的 NGF 反义分子;还可参见 <http://www.rna-tec.com/repair.htm>。

[0134] 在其它实施方案中,NGF 拮抗剂包括至少一种能够阻滞或降低功能性 NGF 受体(诸如 TrkA 和/或 p75)表达的反义分子。Woolf 等,J. Neurosci(2001)21(3):1047-55;Taglialetela 等,J. Neurochem(1996)66(5):1826-35。TrkA 和 p75 的核苷酸序列是已知的,并可很容易地从公众可得到的数据库中获得。

[0135] 可选地,采用基因敲除、吗啉寡核苷酸、RNAi 或核酶,以本领域众所周知的方法可降低 NGF 表达和/或释放和/或 NGF 受体表达。参见 <http://www.macalester.edu/~montgomery/RNAi.html>; <http://pub32.ezboard.com/fmorpholinosfrml9.showMessage?topicID=6.topic>; <http://www.highveld.com/ribozyme.html>。

[0136] 在其它实施方案中,NGF 拮抗剂包括至少一种 NGF 抑制性化合物。本文所使用的“NGF 抑制性化合物”是指除抗 NGF 抗体之外的化合物,其能够直接或间接地减少、抑制、中和或终止 NGF 生物活性。NGF 抑制性化合物应表现出以下任一项或多项特性:(a) 结合 NGF;(b) 抑制 NGF 生物活性或由 NGF 信号功能介导的下游通路;(c) 预防、改善或治疗手术后疼痛的任何方面;(d) 阻滞或降低 NGF 受体活化(包括 TrkA 受体二聚化和/或自磷酸化);(e) 增加 NGF 的清除;(f) 抑制(减少)NGF 合成、生成或释放;(g) 增强自手术的恢复。示

例性 NGF 抑制性化合物包括美国公开序号 20010046959 中所述的小分子 NGF 抑制剂 ;抑制 NGF 与 p75 结合的化合物,如 PCT 公开序号 WO 00/69829 中所述 ;抑制 NGF 与 TrkA 和 / 或 p75 结合的化合物,如 PCT 公开序号 WO 98/17278 中所述。NGF 抑制性化合物的其它实例包括 PCT 公开序号 WO 02/17914 和 WO 02/20479 中所描述的,以及美国专利序号 5,342,942 ; 6,127,401 ;和 6,359,130 中所描述的化合物。其它示例性 NGF 抑制性化合物是作为 NGF 的竞争性抑制剂的化合物。参见美国专利序号 6,291,247。此外,本领域技术人员可制备其它小分子 NGF 抑制性化合物。

[0137] 在某些实施方案中,NGF 抑制性化合物结合 NGF。靶向(结合)的示例性位点包括,但不限于,NGF 中结合 TrkA 受体和 / 或 p75 受体的部分,和 NGF 中邻近受体结合区的那些部分和负责(部分地)受体结合部分的正确三维形状的那些部分。在另一实施方案中,NGF 抑制性化合物结合 NGF 受体(诸如 TrkA 和 / 或 p75),并抑制 NGF 生物活性。靶向的示例性位点包括 TrkA 和 / 或 p75 中结合 NGF 的那些部分。

[0138] 在包含小分子的实施方案中,小分子的分子量可以是约 100-20,000 道尔顿,500-15,000 道尔顿,或 1000-10,000 道尔顿。小分子的文库可通过商业获得。小分子可采用本领域任何已知方法进行施用,包括吸入、腹膜内、静脉内、肌肉内、皮下地、鞘内、心室内、经口、经肠、肠胃外、鼻内或经皮。一般而言,当根据本发明的 NGF-拮抗剂是小分子时,其将以 0.1-300mg/kg 患者体重的比率,分为 1-3 或更多剂量进行施用。对于正常体重的成年患者,可施用范围为 1mg-5g/剂的剂量。

[0139] 在其它实施方案中,NGF 拮抗剂包括至少一种 NGF 结构类似物。本发明中的“NGF 结构类似物”是指三维结构与 NGF 的部分三维结构相似并在生理条件下于体外或体内结合 NGF 受体的化合物,其中所述结合至少部分地抑制 NGF 的生物活性。而一个实施方案中,NGF 结构类似物结合 TrkA 和 / 或 p75 受体。示例性 NGF 结构类似物包括,但不限于,PCT 公开序号 WO 97/15593 中所述二环肽 ;美国专利序号 6,291,247 中所述二环肽 ;美国专利号 6,017,878 中所述环状化合物 ;和 PCT 公开序号 WO89/09225 中所述源于 NGF 的肽。适宜的 NGF 结构类似物还可通过对 NGF-受体结合进行分子建模,例如通过 PCT 公开序号 WO 98/06048 中所述方法进行设计和合成。NGF 结构类似物可以是单体或是通过与相同或不同结构的任何所需组合形成的二聚体 / 寡聚体,以便得到提高的亲力和生物效应。

[0140] 在其它实施方案中,本发明提供了包含至少一种 TrkA 受体和 / 或 p75 受体的显性失活突变体的 NGF 拮抗剂。本领域技术人员可制备例如,TrkA 受体的显性失活突变体以便使该受体结合 NGF 并由此作为“槽子”(sink)俘获 NGF。然而,显性失活突变体在结合 NGF 后不具有 TrkA 受体的正常生物活性。示例性显性失活突变体包括,但不限于,下述参考文件中公开的突变体 :Li 等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1998,95,10884 ;Eide 等,J. Neurosci. 1996,16,3123 ;Liu 等,J. Neurosci 1997,17,8749 ;Klein 等,Cell 1990,61,647 ;Valenzuela 等,Neuron 1993,10,963 ;Tsoulfas 等,Neuron 1993,10,975 和 Lamballe 等,EMBO J 1993,12,3083,各参考文件均全文引入此处作为参考。显性失活突变体可以用蛋白质形式或用可以在体内表达显性失活突变体例如突变 TrkA 受体的表达载体形式进行施用。蛋白质或表达载体可采用本领域任何已知方法进行施用,诸如腹膜内、静脉内、肌肉内、皮下地、鞘内、心室内、经口、经肠、肠胃外、鼻内、经皮或通过吸入。例如,表达载体的施用包括局部或全身施用,包括注射、口服施用、基因枪或插入导管施用,局部施用。本领域技术

人员可很熟练地施用表达载体以获得外源蛋白质在体内的表达。参见例如,美国专利序号 6,436,908 ;6,413,942 和 6,376,471。

[0141] 还可使用包含反义多核苷酸、表达载体或亚基因组多核苷酸的治疗性组合物的靶向递送。受体介导的 DNA 递送技术已被公开于,例如,Findeis 等, *Trends Biotechnol.* (1993)11 :202 ;Chiou 等, *Gene Therapeutics ;Methods And Applications Of Direct Gene Transfer* (J. A. Wolff, ed.) (1994) ;Wu 等, *J. Biol. Chem.* (1988)263 :621 ;Wu 等, *J. Biol. Chem.* (1994)269 :542 ;Zenke 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990)87 :3655 ;Wu 等, *J. Biol. Chem.* (1991)266 :338。包含多核苷酸的治疗性组合物在基因治疗方案中以约 100ng 至约 200mg DNA 局部施用。在某些实施方案中,在基因治疗过程期间还可施用约 500ng 至约 50mg、约 1 μ g 至约 2mg、约 5 μ g 至约 500 μ g 和约 20 μ g 至约 100 μ g 的 DNA 或更高的剂量范围。本发明的治疗性多核苷酸和多肽可采用基因递送运载体进行递送。基因递送运载体可以是病毒或非病毒来源的(通常参见, Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1994)1 :51 ;Kimura, *Human Gene Therapy* (1994)5 :845 ;Connelly, *Human Gene Yherapy* (1995)1 :185 ;和 Kaplitt, *Nature Genetics* (1994)6 :148)。所述编码序列的表达可采用内源性哺乳动物启动子或异源性启动子和 / 或增强子进行引导。编码序列的表达可以是组成性的或被调节的。

[0142] 用于递送所需多核苷酸和在所需细胞中实现表达的基于病毒的载体是本领域众所周知的。示例性基于病毒的载体包括,但不限于,重组反转录病毒(参见例如, PCT 公开序号 WO 90/07936 ;WO 94/03622 ;WO 93/25698 ;WO 93/25234 ;WO 93/11230 ;WO 93/10218 ;WO 91/02805 ;美国专利序号 5,219,740 和 4,777,127 ;GB 专利号 2,200,651 ;和 EP 专利号 0345 242),基于甲病毒的载体(例如,辛德比斯病毒载体、塞姆利基森林病毒(ATCCVR-67, ATCC VR-1247),罗斯河病毒(ATCC VR-373 ;ATCC VR-1246)和委内瑞拉马脑炎病毒(ATCC VR-923 ;ATCC VR-1250 ;ATCC VR 1249 ;ATCC VR-532)),和腺相关病毒(AAV)载体(参见,例如, PCT 公开序号 WO 94/12649, W093/03769 ;W093/19191 ;WO 94/28938 ;WO 95/11984 和 WO 95/00655)。还可使用如 Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992)3 :147 中所述的,与死腺病毒相连接的 DNA 的施用。

[0143] 还可使用非病毒递送运载体和方法,包括但不限于,单独地未与死腺病毒连接的或与之连接的聚阳离子浓缩的 DNA(参见例如, Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992)3 :147) ;与配体连接的 DNA(参见例如, Wu, *J. Biol. Chem.* (1989)264 :16985) ;真核细胞递送运载体细胞(参见例如,美国专利序号 5,814,482 ;PCT 公开序号 WO 95/07994 ;WO 96/17072 ;WO 95/30763 ;和 WO 97/42338)和核电荷中和或与细胞膜融合。还可使用裸 DNA。示例性裸 DNA 导入方法已被公开于 PCT 公开序号 WO 90/11092 和美国专利序号 5,580,859 中。可作为基因递送运载体的脂质体已被公开于美国专利序号 5,422,120 ;PCT 公开序号 W095/13796 ;W094/23697 ;WO 91/14445 ;和 EP 专利号 0524968。其它方法已被公开于 Philip, *Mol. Cell Biol.* (1994)14 :2411 和 Woffendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994)91 :1581 中。

[0144] 很明显,表达载体可被用于指导任何本文所述的基于蛋白质的 NGF 拮抗剂(例如,抗 NGF 抗体, TrkA 免疫粘合素等)的表达。例如,能够阻滞(部分至全部阻滞)NGF 和 / 或 NGF 生物活性的其它 TrkA 受体片段是本领域已知的。

[0145] 在另一实施方案中,NGF 拮抗剂包含至少一种 TrkA 免疫粘合素。本文所使用的

TrkA 免疫粘合素是指可溶性嵌合分子,其包含 TrkA 受体的胞外域和免疫球蛋白序列,其保留了 TrkA 受体的结合特异性(基本上保留了 trkA 受体的结合特异性),且能结合 NGF。

[0146] TrkA 免疫粘合素是本领域中已知的,且已发现其能阻滞 NGF 与 TrkA 受体的结合。参见,例如,美国专利序号 6,153,189。Brennan 等报道了 TrkA 免疫粘合素在手术后疼痛的大鼠模型中的施用。参见 Society for Neuroscience Abstracts 24(1-2)880(1998)。而一个实施方案中,TrkA 免疫粘合素包括来自能够结合 NGF 的 TrkA 胞外域的 TrkA 受体氨基酸序列(或其部分)(在某些实施方案中,氨基酸序列基本上保留了 trkA 受体的结合特异性)和免疫球蛋白序列的融合。在某些实施方案中,TrkA 受体是人类 TrkA 受体序列,且所述融合是与免疫球蛋白恒定区序列的融合。在其它实施方案中,免疫球蛋白恒定区序列是免疫球蛋白重链恒定区序列。在其它实施方案中,两个 TrkA 受体-免疫球蛋白重链融合物的缔合(例如,借助通过二硫键的共价键)产生同型二聚体免疫球蛋白样结构。免疫球蛋白轻链可进一步与二硫键键合的二聚体中的一个或两个 TrkA 受体-免疫球蛋白嵌合体缔合以生成同型三聚体或同型四聚体结构。适宜的 TrkA 免疫粘合素的实例包括如美国专利序号 6,153,189 中所述的那些。

[0147] 在另一实施方案中,NGF 拮抗剂包含至少一种抗 TrkA 抗体,该抗体能阻滞、抑制、改变和/或降低 NGF 与 TrkA 受体的物理相互作用和/或下游信号,由此降低和/或阻滞 NGF 生物活性。抗 TrkA 抗体是本领域已知的。示例性抗 TrkA 抗体包括如 PCT 公开序号 WO 97/21732, W000/73344, WO 02/15924 和美国公开序号 20010046959 所述的那些。

[0148] 在另一实施方案中,NGF 拮抗剂包含至少一种抗 p75 抗体,该抗体能阻滞、抑制和/或降低 NGF 与 p75 受体的物理相互作用和/或下游信号,由此降低和/或阻滞了 NGF 生物活性。

[0149] 在另一实施方案中,NGF 拮抗剂包含至少一种激酶抑制剂,该抑制剂能抑制与 TrkA 和/或 p75 受体活性相关的下游激酶信号传导。示例性激酶抑制剂是 K252a 或 K252b,其是本领域已知的并已被公开于 Knusel 等, J. Neurochem. 59 :715-722(1992) ;Knusel 等, J Neurochemistry 57 :955-962(1991) ;Koizumi 等, J. Neuroscience 8 :715-721(1988) ; Hirata 等, Chemical Abstracts 111 :728, XP00204135, 参见摘要以及 12th Collective Chemical Substance Index, p. 34237, c. 3(5-7), 55-60, 66-69), p. 34238, c. 1(41-44), c. 2(25-27, 32-33), p. 3423, c. 3(48-50, 52-53) 和美国专利序号 6,306,849。

[0150] 可以预期,若临床医师需要,将可鉴定大量其它类型的 NGF 拮抗剂。

[0151] NGF 拮抗剂的鉴定

[0152] 采用本领域已知可检测和/或测定 NGF 生物活性的降低、改善或中和的方法,可对抗 NGF 抗体和其它 NGF 拮抗剂进行鉴定和特征描述。例如,美国专利序号 5,766,863 和 5,891,650 中公开的激酶受体活化(KIRA)测定法可用于鉴定 NGF 拮抗剂,该 ELISA 型测定法适于定性或定量地检测激酶的活化(其中测定受体蛋白酪氨酸激酶(以下称为“rPTK”),例如 TrkA 受体的激酶结构域的自磷酸化作用),以及适用于鉴定和表征选择的 rPTK,例如, TrkA 的可能拮抗剂。此测定法的第一阶段包括激酶受体(例如, TrkA 受体)的激酶结构域的磷酸化,其中受体存在于真核细胞的细胞膜中。该受体可以是内源性受体或可以将编码受体或受体构建体的核酸转化至细胞中。典型地,第一固相(例如,第一测定板的孔)用基本上均质的所述细胞群(通常是哺乳动物细胞系)进行包被,以便将细胞粘附于固相。通

常,细胞具有贴壁性,由此自然地粘附于第一固相。如果使用“受体构建体”,其通常包含激酶受体和 Flag 多肽的融合。Flag 多肽在此测定法的 ELISA 部分中被俘获剂(常是俘获抗体)识别。然后,将分析物,诸如候选抗 NGF 抗体或其它 NGF 拮抗剂,与 NGF 一同加入具有贴壁细胞的孔中,由此将酪氨酸激酶受体(例如 TrkA 受体)暴露于(或接触)NGF 和分析物。该测定法能够鉴定可抑制 TrkA 的配体 NGF 对 TrkA 的活化的抗体(或其他 NGF 拮抗剂)。在暴露于 NGF 和分析物之后,采用裂解缓冲液(其中含有增溶性去污剂)以溶解贴壁的细胞,然后轻柔搅拌,由此释放细胞裂解产物,其可被直接用于本测定法的 ELISA 部分,而无须对细胞裂解产物浓缩或澄清化。

[0153] 然后将由此制备的细胞裂解产物置于本测定法的 ELISA 阶段。作为 ELISA 阶段的第一步,用俘获剂(常是俘获抗体)包被第二固相(通常是 ELISA 微量滴定板的孔),所述俘获剂特异性结合酪氨酸激酶受体,或(在受体构建体的情况下)结合 Flag 多肽。对第二固相实施包被,以便使俘获剂粘附于第二固相。俘获剂一般是单克隆抗体,但,如本文实施例中所述,还可以使用多克隆抗体。然后将得到的细胞裂解产物暴露于,或接触粘附的俘获剂,以便使受体或受体构建体粘附于(或被俘获于)第二固相。然后实施洗涤步骤,以便除去未结合的细胞裂解产物,而保留俘获的受体或受体构建体。然后将粘附的或俘获的受体或受体构建体暴露于或接触能够鉴定酪氨酸激酶受体中磷酸化的酪氨酸残基的抗磷酸酪氨酸抗体。而一个实施方案中,抗磷酸酪氨酸抗体与酶缀合(直接或间接),所述酶催化非放射性颜色试剂的颜色改变。由此,可通过随后试剂的颜色改变而检测受体的磷酸化。可将该酶直接结合于抗磷酸酪氨酸抗体,或可将缀合性分子(例如,生物素)缀合于抗磷酸酪氨酸抗体上,随后可借助此缀合性分子而将酶结合于抗磷酸酪氨酸抗体上。最终,例如,通过颜色试剂的颜色改变来检测抗磷酸酪氨酸抗体与俘获的受体或受体构建体的结合。

[0154] NGF 拮抗剂还可通过将候选试剂和 NGF 孵育和监测以下一项或多项特性而进行鉴定:(a) 结合 NGF;(b) 抑制 NGF 生物活性或由 NGF 信号功能介导的下游通路;(c) 抑制、阻滞或降低 NGF 受体活化(包括 TrkA 受体二聚化和/或自磷酸化);(d) 增加 NGF 的清除;(e) 预防或治疗手术后疼痛的任何方面;(f) 抑制(减少)NGF 合成、生成或释放;(g) 增强自手术的恢复。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂可通过将候选试剂和 NGF 孵育并监测结合及与之伴随的 NGF 生物活性的降低或中和而进行鉴定。结合测定法可采用纯化的 NGF 多肽,或采用天然表达或转染表达 NGF 多肽的细胞来实施。而一个实施方案中,结合测定法是竞争性结合测定法,其中评估候选抗体与已知 NGF 拮抗剂竞争结合 NGF 的能力。该测定法可以用多种形式(包括 ELISA 形式)实施。在其它实施方案中,NGF 拮抗剂可通过将候选试剂和 NGF 孵育并监测与之伴随的对 TrkA 受体的二聚化和/或自磷酸化的抑制而进行鉴定。

[0155] 初步鉴定后,可通过生物测定法(已知用于检测靶向生物活性)来进一步证实和精细化候选抗 NGF 拮抗剂的活性。可选地,生物测定法可被用于直接筛选候选物。例如,NGF 促进应答细胞中多种形态学上可识别的改变。其包括,但不限于,促进 PC 12 细胞的分化和增强神经突从这些细胞的生长(Urfer 等, *Biochem.* 36 :4775-4781(1997);Tsoulfas 等, *Neuron* 10 :975-990(1993)),促进神经突从应答性感觉和交感神经节外植体向外生长(Levi-Montalcini, R. 和 Angeletti, P. 神经生长因子, *Physiol. Rev.* 48, 534-569, 1968)以及促进 NGF 依赖性神经元诸如胚胎背根神经节、三叉神经节或交感神经节神经元的存活(例如, Chun & Patterson, *Dev. Biol.* 75 :705-711, (1977);Buchman & Davies,

Development 118 :989-1001, (1993)。由此,用于 NGF 生物活性抑制的测定法需要将 NGF 应答细胞与 NGF 加分析物,诸如候选抗 NGF 抗体或候选 NGF 拮抗剂一同培养。适宜时间后,测定细胞反应(细胞分化、神经突向外生长或细胞存活)。

[0156] 候选 NGF 拮抗剂阻滞或中和 NGF 生物活性的能力还可通过监测候选剂在胚胎大鼠背根神经节存活生物测定法中抑制 NGF 介导的存活的能力而进行评估,如 Hongo 等,Hybridoma 19 :215-227(2000) 中所述。

[0157] 用于本发明方法的组合物

[0158] 用于本发明方法中的组合物包含有效量的 NGF 拮抗剂(诸如抗 NGF 抗体),而在某些实施方案中,还包含药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中,该组合物用于本文所述的任何方法中。所述组合物以及其配制方法的实例也在前面和下面的章节中给出描述。而一个实施方案中,组合物包含 NGF 拮抗剂。在另一实施方案中,组合物包含一种或多种 NGF 拮抗剂。在另一实施方案中,组合物包含一种或多种选自以下一项或多项的 NGF 拮抗剂:结合(物理上相互作用于)NGF 的拮抗剂(例如,抗体),结合 NGF 受体(诸如 trkA 受体和/或 p75 受体)的拮抗剂,和降低(阻碍和/或阻滞)下游 NGF 受体信号的拮抗剂。而在其它实施方案中,组合物包含非 TrkA 免疫粘合素的任何 NGF 拮抗剂(即,排除 TrkA 免疫粘合素)。在其它实施方案中,组合物包含非抗 NGF 抗体的任何 NGF 拮抗剂。而在其它实施方案中,组合物包含既不是 TrkA 免疫粘合素且不是抗 NGF 抗体的任何 NGF 拮抗剂。在其它实施方案中,NGF 拮抗剂抑制(降低)NGF 合成、生成或释放。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂结合 NGF 且不与相关神经营养蛋白(诸如 NT3、NT4/5 和/或 BDNF)发生显著交叉反应。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂不与不良免疫反应相关。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂选自:抗 NGF 抗体,针对 NGF 的反义分子(包括针对编码 NGF 的核酸的反义分子),针对 NGF 受体(诸如 trkA 和/或 p75)的反义分子,NGF 抑制性化合物,NGF 结构类似物,与 NGF 结合的 TrkA 受体的显性失活突变体,TrkA 免疫粘合素,抗 TrkA 抗体,抗 p75 抗体,和激酶抑制剂。在另一实施方案中,NGF 拮抗剂是抗 NGF 抗体。在其它实施方案中,抗 NGF 抗体识别人类 NGF。在某些实施方案中,抗 NGF 抗体是人的。而在其它实施方案中,抗 NGF 抗体是人源化的(诸如本文所述的抗体 E3)。而在其它实施方案中,抗 NGF 抗体包含不会触发不需要的或不良的免疫反应,诸如抗体介导的裂解或 ADCC 的恒定区。在其它实施方案中,抗 NGF 抗体包含抗体 E3 的一个或多个 CDR(s)(诸如一个、两个、三个、四个、五个,或在有些实施方案中所有六个来自 E3 的 CDRs)。

[0159] 应当理解的是,组合物可包含一种以上的 NGF 拮抗剂。例如,组合物可包含一类 NGF 拮抗剂的一个以上成员(例如,能识别 NGF 不同表位的抗 NGF 抗体的混合物),以及不同类 NGF 拮抗剂的成员(例如,抗 NGF 抗体和 NGF 抑制性化合物)。其它示例性组合物包含识别相同表位的一种以上抗 NGF 抗体,结合 NGF 不同表位的不同种抗 NGF 抗体或不同的 NGF 抑制性化合物。

[0160] 本发明使用的组合物可进一步包含药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington:The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams 和 Wilkins, Ed. K. E. Hoover.),以冻干制剂或水溶液的形式。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在剂量和浓度上对受者是无毒的,其可包括缓冲液诸如磷酸盐、枸橼酸盐和其它有机酸;包括维生素 C 和甲硫氨酸的抗氧化剂;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化

铵；六甲氯铵；苯扎氯铵，苄索氯铵，酚，丁基或苄基醇；对羟苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲基或丙基酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇和间甲苯酚；低分子量（低于约 10 个残基）多肽；蛋白质诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖，二糖和其它糖类包括葡萄糖、甘露糖或右旋糖酐；螯合剂诸如 EDTA；糖诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐性反荷离子诸如钠；金属复合物（例如 Zn 蛋白质复合物）；和 / 或非离子表面活性剂诸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇（PEG）。本文进一步描述了药学上可接受的赋形剂。NGF 拮抗剂及其组合物还可与增强和 / 或补充药剂的功效的其它药剂联合使用。

[0161] 试剂盒

[0162] 本发明还提供了用于本发明方法的试剂盒。本发明的试剂盒包括一个或多个包含 NGF 拮抗剂（诸如抗体，诸如本文所述的人源化抗体 E3）的容器，而且在某些实施方案中，还包括根据本发明的任何方法进行使用的说明书。在某些实施方案中，NGF 拮抗剂是本文所述的任何 NGF 拮抗剂。而在其它实施方案中，试剂盒包括非 TrkA 免疫粘合物（即，不是 TrkA 免疫粘合物）的 NGF 拮抗剂。在其它实施方案中，试剂盒包括非抗 NGF 抗体的 NGF 拮抗剂。而在其它实施方案中，试剂盒包括不是 TrkA 免疫粘合物且不是抗 NGF 抗体的任何 NGF 拮抗剂。在某些实施方案中，试剂盒包括抗 NGF 抗体（诸如本文所述的抗体 E3）。在其它实施方案中，试剂盒包括抗 NGF 抗体，该抗体包含抗体 E3 的一个或多个 CDR(s)（诸如一个、两个、三个、四个、五个，或在一些实施方案中所有六个来自 E3 的 CDRs）。在某些实施方案中，说明书包括根据本发明所述的任何方法施用 NGF 拮抗剂来治疗、改善或预防手术后疼痛的描述。试剂盒还可包括根据鉴别个体是否具有手术后疼痛或个体是否有发生手术后疼痛的危险而选择适用于治疗的个体的描述。而在其它实施方案中，说明书包括施用 NGF 拮抗剂来治疗、预防和 / 或改善手术后疼痛的描述。而在其它实施方案中，说明书包括对具有发生手术后疼痛危险的个体施用 NGF 拮抗剂的描述。

[0163] 关于使用 NGF 拮抗剂的说明书一般包括这样的信息，即，用于预期治疗的剂量、给药方案和给药途径。容器可以是单位剂量、大包装（例如，多剂量包装）或亚单位剂量。本发明的试剂盒中提供的说明书通常是写于标签或包装插入物（例如，试剂盒包含的纸片）上的说明书，但机器可读说明书（例如，由磁或光存储碟片携带的说明书）也是可接受的。

[0164] 标签或包装插入物指明组合物用于治疗、改善和 / 或预防手术后疼痛。说明书可被提供用于实施本文所述任何方法。

[0165] 本发明的试剂盒是适宜的包装形式。适宜的包装形式包括，但不限于小瓶、瓶、罐、软包装（例如，密封 Mylar 或塑料袋），等。联合特定装置，诸如吸入器、经鼻给药装置（例如，雾化器）或输注装置诸如微泵而进行使用的包装也是可预期的。试剂盒可具有无菌入口（例如容器可以是静脉用溶液袋或瓶，其具有可通过皮下注射针头刺穿的塞子）。容器也可具有无菌入口（例如容器可以是静脉用溶液袋或瓶，其具有可通过皮下注射针头刺穿的塞子）。组合物中至少一种活性成分是 NGF 拮抗剂，诸如抗 NGF 抗体。容器可进一步包含第二药学上活性药剂。

[0166] 试剂盒可任选地提供其它组分诸如缓冲液和说明信息。通常，试剂盒包括容器和容器上的或与之连接的标签或包装插入物。

[0167] NGF 拮抗剂的施用和治疗评估

[0168] NGF 拮抗剂可借助任何适宜的途径施用于个体。例如,NGF 拮抗剂可经口、静脉内、舌下、皮下、动脉内、滑膜内、膀胱内(诸如经由膀胱)、肌内、心内、胸内、腹膜内、心室内、舌下、吸入、借助栓剂和经皮进行施用。它们可经口,例如以通过本领域已知的方法制备的片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂、棒棒糖(Lolliipop)、咀嚼胶等形式进行施用。对本领域技术人员显而易见的,本文所述的实例并非意在限制而是用于例举说明可用技术。

[0169] 由此,在某些实施方案中,NGF 拮抗剂(诸如抗 NGF 抗体)可按照已知的方法而被施用于个体,诸如静脉内施用,例如,推注或一段时间内连续输注,通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、经口、吸入或局部途径。商业上可获得的用于液体制剂的雾化器(包括喷射雾化器和超声雾化器)可用于施用。液体制剂可被直接雾化,而冻干的粉末可在复水之后被雾化。可选地,NGF 拮抗剂可采用碳氟化合物制剂和定量吸入器进行气雾化,或以冻干且研碎的粉末形式被吸入。

[0170] 而一个实施方案中,NGF 拮抗剂经由位点特异性或靶向的局部递送技术进行递送。位点特异性或靶向的局部递送技术的实例包括各种 NGF 拮抗剂的可植入的贮存源或局部递送导管,诸如输注导管、留置导管或针头导管,合成移植物,外膜包裹物(adventitial wraps),分流器(shunt)和支架或其它可植入的装置,位点特异性载体,直接注射,或直接施用。参见例如,PCT 公开序号 WO 00/53211 和美国专利序号 5,981,568。

[0171] NGF 拮抗剂(诸如抗 NGF 抗体)的各种制剂均可被用于给药。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂可单独地进行施用。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂包括抗 NGF 抗体,且可以是各种制剂,包括包含药学上可接受的赋形剂的制剂。

[0172] 药学上可接受的赋形剂是本领域已知的,是相对惰性的物质,其能促进药理学上有效的物质的施用。例如,赋形剂赋予形状或稠度,或发挥稀释剂的作用。适宜的赋形剂包括(但不限于)稳定剂、湿润剂和乳化剂、改变摩尔渗透压浓度的盐、成胶囊剂、缓冲液和透皮促进剂。用于胃肠外和非胃肠外药物递送的赋形剂以及制剂已被公开于 Remington,等, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing(2000)。

[0173] 在某些实施方案中,这些药剂可被制备为用于通过注射(例如,经腹膜内、静脉内、皮下、肌内等)给药的制剂。由此,这些药剂可与药学上可接受的载体诸如盐水、林格氏液、葡萄糖溶液等组合。具体的剂量方案,即,剂量、给药时间和重复,应根据具体的个体和个体的医疗史决定。

[0174] 施用抗 NGF 抗体可采用任何适宜的方法,包括经注射(例如,经腹膜内、静脉内、皮下、肌内等)。抗 NGF 抗体还可经由吸入进行施用,如本文所述。一般地,对于施用抗 NGF 抗体,初始候选剂量可以是约 2mg/kg。为了本发明的目的,典型的每日剂量可以是约 3 μ g/kg 至 30 μ g/kg 至 300 μ g/kg 至 3mg/kg 至 30mg/kg 至 100mg/kg 或更高,这要根据上述因素决定。对于在数日或更长时间(根据病症)内的重复施用,持续治疗直至出现期望的症状抑制或直至达到降低手术后疼痛的足够治疗水平。示例性的剂量方案包括施用初始剂量约 2mg/kg,随后抗 NGF 抗体的每周维持剂量为约 1mg/kg,或随后每隔一周维持剂量为约 1mg/kg。然而,其它剂量方案也是可用的,这取决于医师希望实现的药代动力学衰减模式。例如,每周 1-4 次给药是可以预期的。该治疗的进展可通过常规技术和测定法而被很容易地监测。剂量方案(包括使用的 NGF 拮抗剂)可随时间改变。

[0175] 一般地,当 NGF 拮抗剂不是抗体时,NGF 拮抗剂可(在某些实施方案中)按约 0.1-300mg/kg 患者体重的速率分成 1-3 个剂量施用,或如本文所述施用。在某些实施方案中,对于正常体重的成年患者,可以施用约 0.3-5.00mg/kg 的剂量。具体的剂量方案,即,剂量、给药时间和重复,应根据具体的个体和个体的医疗史,以及各药剂的特性(诸如药剂的半寿期,和本领域众所周知的其它考虑因素)而决定。

[0176] 为了本发明的目的,NGF 拮抗剂的适宜剂量应取决于施用的 NGF 拮抗剂(或其组合物),要治疗的疼痛类型和严重度,药剂是否被用于预防性或治疗性目的,在先治疗、患者的临床史和对药剂的反应,和主治医师的判断。典型地,临床医师将施用 NGF 拮抗剂,诸如抗 NGF 抗体,直至剂量达到可实现需要的结果的剂量。

[0177] 经验性考虑因素,诸如半寿期,一般将有助于对剂量的确定。例如,与人类免疫系统相容的抗体,诸如人源化抗体或完全人类抗体可被用于延长抗体的半寿期和防止抗体被宿主的免疫系统攻击。施用频率可在治疗过程期间进行确定和调整,通常(但非必须地)这基于疼痛的治疗和/或抑制和/或改善和/或延缓而定。可选地,NGF 抗体的持久连续释放制剂可能是适宜的。获得持续释放的多种制剂和装置是本领域所已知的。

[0178] 在一个实施方案中,在已一或多次接受 NGF 拮抗剂(诸如抗体)施用的个体中经验性地确定 NGF 拮抗剂的剂量。给予个体递增剂量的 NGF 拮抗剂(例如,抗 NGF 抗体)。为了评估 NGF 拮抗剂的功效,可跟踪疼痛的指征。

[0179] 根据本发明的方法施用 NGF 拮抗剂可以是连续的或间断的,这要依赖于例如受者的生理条件、施用目的是治疗性的还是预防性的,以及本领域执业医师已知的其它因素。NGF 拮抗剂(例如如果 NGF 拮抗剂是抗 NGF 抗体)的施用可以是在一个预选的时间段内基本上连续的或可以是一系列的间隔给药,例如,在疼痛发生之前,期间或之后;疼痛发生之前;期间;之前和之后;期间和之后;之前和期间;或之前、期间和之后。施用可以是在损伤、切割、创伤、手术和其它任何可能引起手术后疼痛的事件之前、期间和/或之后。

[0180] 在某些实施方案中,可存在多于一种 NGF 拮抗剂,诸如抗体。该拮抗剂可以是彼此相同或彼此不同的。可存在至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种不同的 NGF 拮抗剂。一般而言,所述 NGF 拮抗剂具有彼此间无不利作用的互补活性。NGF 拮抗剂还可与增强和/或补充该药剂的功效的其它药剂联合使用。

[0181] 根据本发明所使用的 NGF 拮抗剂(诸如抗体)的治疗性制剂可通过将具有所需纯度的抗体与任选的药理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing(2000))混合而制备成冻干制剂或水溶液的形式用于保藏。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量和浓度下不具有对受者的毒性,并可包括缓冲液诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;盐诸如氯化钠;包括抗坏血酸和甲硫氨酸的抗氧化剂;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚,丁基或苄基醇;对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲基或丙基酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲苯酚);低分子量(少于约 10 个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖,和包括葡萄糖、甘露糖或糊精的其它糖类;螯合剂诸如 EDTA;糖诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐性反离子诸如钠;金属复合物(例如 Zn 蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂诸如 TWEEN™、

PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。

[0182] 包含 NGF 拮抗剂 (诸如抗体) 的脂质体可通过本领域已知的方法制备, 所述方法诸如 Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 和美国专利序号 4,485,045 和 4,544,545 中所示。美国专利序号 5,013,556 中公开了循环时间提高的脂质体。尤其有用的脂质体可通过采用脂质组合物的反相蒸发法来生成, 所示脂质组合物包含磷脂酰胆碱、胆固醇和聚乙二醇衍生的磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE)。将脂质体挤压通过具有确定孔径的滤器, 以便生成具有所需直径的脂质体。

[0183] 活性成分还可截留在胶体递药系统 (例如, 脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米粒和纳米囊) 或粗乳剂中, 或者在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊, 例如, 羟甲基纤维素或明胶微囊和聚 (甲基丙烯酸甲酯) 微囊中。所述技术已被公开于 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing(2000) 中。

[0184] 可制备缓释制剂。缓释制剂的适宜实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质, 该基质的形式可以是成形物、例如膜, 或微囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶 (例如, 聚 (2-羟乙基-甲基丙烯酸酯), 或聚 (乙烯醇)、聚乳酸 (美国专利号 3,773,919)、L-谷氨酸和 7-乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-醋酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™ (由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射的微球体)、蔗糖醋酸异丁酸酯和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0185] 用于体内施用的制剂必须是无菌的。这可通过例如, 经过除菌滤过膜的过滤而很容易地实现。治疗性抗 NGF 抗体组合物通常被置于具有无菌入口的容器中, 所述容器为例如, 静脉用溶液袋或瓶 (其具有可通过皮下注射针头刺穿的塞子)。

[0186] 根据本发明的组合物可以是单位剂型诸如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、溶液或混悬剂, 或栓剂, 而用于经口、非胃肠的或经直肠的使用, 或通过吸入或吹入的施用。

[0187] 为了制备固体组合物诸如片剂, 将主要活性成分与药学载体, 例如常规压片成分诸如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸氢钙或树胶和其它药学稀释剂, 例如水, 混合, 以形成包含本发明化合物或其无毒性药学上可接受盐的均质混合物的固体预制组合物 (preformulation composition)。当提及这些预制组合物为均质形式时, 其意指活性成分均匀地分散于整个组合物中以致使组合物可易于细分为同等有效的单位剂型诸如片剂、丸剂和胶囊剂。该固体预制组合物然后被细分为上述类型的单位剂型, 其中包含 0.1-约 500mg 本发明的活性成分。新型组合物的片剂或丸剂可被包衣或复合以生成能提供长效优势的剂型。例如, 片剂或丸剂可包括内部剂量和外部剂量组分, 后者为包封在前者上的形式。该两种组分可被肠衣分开, 肠衣的作用在于抵抗胃内崩解和使内部组分可完好地进入十二指肠或延迟释放。多种材料可用于所述肠衣或包衣层, 这些材料包括多种聚合酸 (polymeric acid) 和聚合酸与诸如紫胶、鲸蜡醇和乙酸纤维素的材料的混合物。

[0188] 适宜的表面活性剂包括, 特别是, 非离子表面活性剂, 诸如聚氧乙烯失水山梨醇 (例如 Tween™20、40、60、80 或 85) 和其它失水山梨醇 (例如 Span™20、40、60、80 或 85)。具有表面活性剂的组合物应适宜地包括 0.05-5% 的表面活性剂, 其可以是 0.1-2.5%。应当认识到, 如有需要, 可加入其它成分, 例如甘露醇或其它药学上可接受的载体。

[0189] 适宜的乳剂可采用商业上可获得的脂肪乳, 诸如 Intralipid™、Liposyn™、

Infonutrol™、Lipofundin™ 和 Lipiphysan™ 来制备。活性成分可溶解于预先混合的乳剂组合物中或可选地其可溶解于油（例如豆油、红花油、棉籽油、麻油、玉米油或杏仁油）和通过将磷脂（例如卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂）和水混合而形成的乳液中。应当认识到，可加入其它成分，例如甘油或葡萄糖，来调整乳剂的张力。适宜的乳剂通常包含不超过 20% 的油，例如，5-20%。脂肪乳可包含 0.1-1.0 μm，特别是 0.1-0.5 μm 的脂肪滴，且 pH 为 5.5-8.0。

[0190] 乳剂组合物可通过将神经生长因子拮抗剂和 Intralipid™ 或其组分（豆油、卵磷脂、甘油和水）混合来制备。

[0191] 用于吸入或吹入的组合物包括在药学可接受的水性或有机溶剂或其混合物中的溶液和混悬液，和粉末。液体或固体组合物可包含上述适宜的药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中，组合物通过经口或经鼻的呼吸途径进行施用以便产生局部或全身效应。在优选无菌的药学上可接受的溶剂中的组合物可通过使用气体而被雾化。雾化后的溶液可经由喷雾装置直接呼吸，或可将喷雾装置连接于面罩、帷罩或间歇正压呼吸机上。溶液、混悬液或粉末组合物可由能以适宜的方式递送制剂的装置进行递送，优选经口或经鼻。

[0192] 治疗效果可通过本领域众所周知的方法进行评估。

实施例

[0193] 以下实施例用于例举说明而并非限制本发明。

[0194] 实施例 1

[0195] 抗 NGF 单克隆抗体可有效治疗手术后疼痛

[0196] 我们使用模拟手术后疼痛的疼痛模型来评价抗 NGF 抗体 911（小鼠单克隆抗体；参见 Hongo 等, Hybridoma 19:215-227 (2000) 的治疗功效。每个试验包括 16 只动物 (n = 8/组)。在作切割前 15 小时，将抗 NGF 抗体注射至腹膜内 (i.p.)，对于各个试验，抗体的浓度不同 (35 或 7 毫克/公斤)。对照组不接受抗体，而是腹膜内注射盐水溶液。

[0197] 动物。体重为 220-240 克的雄性 Sprague Dawley 大鼠购自 Harlan (San Diego)，在手术前，使其在动物舍中适应一周。

[0198] 手术。根据 Brennan, 等, Pain 64:493-501 (1996) 所公开的步骤实施手术。用空气混合物中的 2% 异氟烷麻醉动物，并于手术期间经由鼻锥维持。用聚维酮碘垫准备右后爪的跖面，经皮肤和肌膜做 1-cm 中心纵向切割，始于距踵边 0.5cm 处并向足趾延伸。将足保持于弯曲状态，用尺进行测量。用弯钳提起跖肌然后纵向切开。肌肉在起端 (origin) 和止端 (insertion) 之间被最大深度切开。手术全程通过用纱布垫施加按压来控制出血。以两次褥式缝合 (5-0 黑色单股缝合线 (ethilon)) 闭合伤口。这些缝线打结 5-6 次，第一个结松扎。用杆菌肽溶液擦洗伤口点。使动物恢复，将其静置于干净笼中两小时或更久直至行为试验开始。

[0199] 评估静止痛。将累积的疼痛评分用于评估与承重相关的疼痛。将动物置于干净塑料笼中的塑料网（网格：8mm²）上，将塑料笼提升至高处平台 (h:18")，以便观察其爪的底面。适应 20 分钟后，以 0-2 的标度评估承重。如果爪变白或压在網上则评分为 0，这提示承受全部体重。如果爪偏向于仅以皮肤接触网，而没有变白或皮肤凹痕，则评分为 1。如果爪完全松离网，则评分为 2。如果大鼠仍处于静止，爪退缩被认为是 2。在 30 分钟内，每 5 分

钟观察各个动物 1 分钟。在 1/2 小时期间所得 6 个评分的总和 (0-12) 被用于评估具有切口的足中的疼痛。还计算了评分为 2 的频率,并将其用于评估严重疼痛或动物对爪的完全保护的发生率。在手术前 24 小时 (基线),和手术后 2 小时、24 小时、48 小时和 72 小时对所有动物进行实验。该实验的结果如图 1 中所示,该图显示了在用 35mg/kg 抗 NGF 小鼠抗体 911 治疗的动物中观察到的累积的静止痛评分。这些结果证实了采用抗 NGF 抗体治疗显著降低了手术后静止痛。承重与动物使用肢体的愿意度良好相关,由此是疼痛缓解的有效测量手段。

[0200] 采用触觉异常性疼痛 (Tactile Allodynia) 评估机械性引发的疼痛。触觉异常性疼痛通过采用 Semmes-Weinstein von Frey 毛 (Stoelting, Wood Dale, IL) 进行检测。将动物置于 12mm 塑料网底笼中,然后将笼提升至高处平台 (h:18"),以便观察其爪的底面。实验开始前,使动物习惯该环境 (前一周经 1-2 天)。15 分钟顺应期后,通过采用 von Frey 毛以递增的力在切割入口点的内侧和邻近处触碰动物后爪踵上的皮肤,直至引起爪回撤反应,从而测试触觉异常性疼痛。采用 4.08-5.46 号 Von Frey;各个号与以克计的力相关,如下述。将各个 von Frey 毛以直角施用于表面上,弯曲毛 2 秒,或直至出现反应。一旦出现回撤反应,将该爪进行两个实验测试,以下一个递减的 von Frey 毛开始,直至不出现反应。

[0201] 记录三个实验中引发反应所需的最低力量,作为以克计的回撤阈。提起爪以及引发反应的最高力为 29g,由此作为截断值。如果未检测到反应,记录下一个递增丝 "5.88"。以该方法测试左和右爪。在手术前 24 小时 (基线),和手术后 2h、24h、48h,和 72h 对每只动物进行测试。在静止痛评分后,测试触觉异常性疼痛。该实验的结果显示于图 3 中,其中提供了在用 7mg/kg 抗 NGF 抗体 911 治疗的动物中应答机械性刺激的累积评分。这些结果证实了用抗 NGF 抗体治疗降低了手术后机械性引发的疼痛。

[0202] 评估热痛觉过敏。通过大鼠跖试验 (Ugo Basile, Italy),根据 Hargreaves,等 (1988) 的改良方法来评估热痛觉过敏。使得大鼠适应装置,所述装置由放置在抬高的玻璃台上的四个独立的有机玻璃盒组成。将移动式辐射热源放置在台下方,集中于后爪上。在动物静止但未睡眠时,按压控制箱上的按钮,开始给予辐射热源,然后自动记录动物从热源回撤经过的时间。该爪回撤潜伏时间 (PWL) 通过埋在辐射热源中的光检测器而进行检测,所述检测器通过辐射源的反射的变化来感知大鼠爪的运动。记录爪回撤潜伏时间,以秒计。为了防止组织损伤,采用 22.5 秒的自动截断点。对各个动物的两只后爪均记录 PWL 3-4 次,其平均值是代表右和左后爪的基线。这些结果被表示为在右爪 (手术位点) 和左爪中检测到的评分的比率。对装置校准一次 (实验开始时),设定强度 40,以便给出大约 6 秒的正常 PWL。在手术前 24 小时 (基线),和手术后 3h、24h、48h,和 72h 对每只动物进行测试。热痛觉过敏检测在触觉异常性疼痛检测之后实施。该实验的结果显示于图 2 中,其中提供了在用 35mg/kg 抗 NGF 抗体 911 治疗的动物中观察到的对热刺激反应的累积评分。这些结果证实了用抗 NGF 抗体治疗显著降低了手术后的热痛觉过敏。

[0203] 实施例 2

[0204] 采用人源化抗 NGF 抗体治疗手术后疼痛和与手术后疼痛的阿片样物质治疗的比较

[0205] 命名为 E3 的人源化抗 NGF 抗体对手术后疼痛的作用在如实施例 1 中所述的用于手术后疼痛的动物模型中进行了检测。E3 抗体包括人类重链 IgG2a 恒定区 (其包含以下

突变 :A330P331 至 S330S331 (氨基酸编号参考野生型 IgG2a 序列 ;参见 Eur. J. Immunol. (1999) 29 :2613-2624)) ;人类轻链 κ 恒定区 ;和重链和轻链可变区,如表 1 和 2 中所示。

[0206] 在造成切口前 15 小时,将抗 NGF 抗体以多种抗体浓度 (0.004、0.01、0.02、0.1、0.6 和 1mg/ 公斤动物体重) 经腹膜内 (i. p.) 进行注射。阴性对照组不接受抗体,而腹膜内注射盐水溶液。在手术后 24 小时,实验前 30 分钟,经 i. p. 注射 0.01mg/kg 芬太尼作为阳性对照。对于各个情况,每个试验包括 8 只动物 ($n = 8/\text{组}$),而对照组包括 56 只动物。除了雄性 Sprague Dawley 大鼠购自 Harlan(Wisconsin) 外,如实施例 1 所述,实施手术并记录累积的疼痛评分。如实施例 1 所述,在手术后 24 小时评估静止痛。

[0207] 如图 4 中所示,当以 0.02mg/kg-1mg/kg 的剂量施用,人源化抗 NGF 抗体 E3 显著降低了手术后静止痛 ($p < 0.05$)。“*”表示与对照的显著性差异 ($p < 0.05$)。采用 0.02mg/kg 的治疗至少与 0.01mg/kg 芬太尼同等有效地缓解疼痛行为。芬太尼的该剂量是该强阿片样药剂的正常人类剂量的 10 倍。

[0208] 实施例 3

[0209] 采用抗 NGF 抗体对手术后疼痛的手术前和手术后治疗

[0210] 当在造成切口后施用,采用购自 Harlan(Wisconsin) 的雄性 Sprague Dawley 大鼠,在实施例 1 所述手术后疼痛动物模型中检测抗 NGF 抗体降低手术后疼痛的功效。在造成切口后 2 小时,静脉内 (i. v.) 注射人源化抗 NGF 抗体 E3 (0.5mg/kg)。对照组不接受抗体,而静脉内注射盐水溶液。如实施例 1 所述,实施手术,并在手术后 24 小时评估以累积的疼痛评分表示的静止痛。如图 5 所示,当在切口造成后 2 小时施用抗体,用抗 NGF 抗体治疗显著降低切口形成后 24 小时的静止痛 ($p < 0.05$)。这些结果证实了当在手术后施用,抗 NGF 有效改善了手术后疼痛。

[0211] 采用购自 Harlan(Wisconsin) 的雄性 Sprague Dawley 大鼠,在实施例 1 所述动物模型中检测在手术前 14 或 21 天施用抗 NGF 抗体降低手术后疼痛的功效。在切开术前 14 日或 21 日,经 i. p. 注射多种浓度 (1mg/kg 或 5mg/kg) 的抗 NGF 小鼠单克隆抗体 911。对照组经 i. p. 注射盐水溶液。如实施例 1 所述,实施手术,并在手术后 24 小时评估以累积的疼痛评分表示的静止痛。如图 6 和 7 所示,当在手术前 14 日施用,5mg/kg 剂量的抗 NGF 抗体 911 显著降低了静止痛,并在手术前 21 日注射时,降低了静止痛。

[0212] 实施例 4

[0213] 采用抗 NGF 抗体治疗对伤口愈合无作用

[0214] 在科技文献中存在以下提示 :采用过量 NGF 治疗可促进糖尿病动物 (Matsuda 等, (1998) J Exp Med 187 (3) :297-30) 以及角膜溃疡和皮肤 (Lambiase 等, (2003) Arch Ital Biol. 141 (2-3) :141-8) 中的伤口愈合。为了确定使用抗 NGF 抗体是否会损害伤口愈合,在大鼠中检测抗 NGF 抗体治疗对伤口愈合的影响。

[0215] 体重为 250-350 克的雄性 Sprague Dawley 大鼠购自 Harlan(Wisconsin),将其置于设备中,使之适应至少一周。用异氟烷麻醉动物,然后剃刮背表面 (背部) 的毛,用聚维酮碘然后酒精垫清洁。在肩胛骨之间中线,作 2.5cm 经皮切口。用纱布垫施加按压来控制出血。以四个单股 4-0 ethilon 缝线来闭合伤口,使动物恢复。然后将动物分为三组 :一组在手术时接受单剂小鼠单克隆抗 NGF 抗体 911 (1mg/kg, i. p.) ;一组接受酮洛来克 (5mg/kg 每日,自手术之日开始五日,肌肉 (IM)) 作为阳性对照 ;和盐水处理对照组 (阴性对照)。酮

洛来克已知能抑制伤口愈合。Haws等, (1996) Ann Plast Surg. 37 (2) :147-51 ;Gerstenfeld等, (2003) J Orthop Res. 21 (4) :670-5。

[0216] 从手术后第一日开始,每日对切割区域进行检查和拍照。手术后第2日拆线。如果全部切口保持闭合,则将切口评为“完整”,而如果某些或全部切口重新找开,则评为“失败”。结果用完整伤口的比率表示(即,完整伤口的数量除以进行评分的动物总数量)。

[0217] 如图8所示,用抗NGF抗体911治疗的动物与用盐水治疗的动物的伤口愈合不存在显著性差异。因此,抗NGF治疗显示出对伤口愈合不具有明显影响。相反,当与盐水或抗NGF抗体911治疗的动物相比较时,酮洛来克治疗的动物中伤口愈合受到显著性的抑制($p < 0.0005$)。

[0218] 还在用抗NGF抗体治疗的三只大鼠和用盐水治疗的三只大鼠中检查了愈合伤口的组织学外观。切开术后21日,处死动物,将包括切割区域的皮肤样本在福尔马林中固定,石蜡包埋然后对切割位点进行横向切片。用抗NGF抗体或盐水处理这些切片,用苏木素和伊红染色,然后由不知晓动物处理的兽医病理学家对其进行检查。在两组大鼠中均未发现伤口愈合的异常。

[0219] 实施例5

[0220] 采用小分子NGF拮抗剂,K252a治疗手术后疼痛

[0221] 在实施例1所述切割模型中检测NGF拮抗剂K252a治疗手术后疼痛的功效。在DMSO中制备25mg/ml的K252a溶液。在250 μ l该溶液中,加入3500 μ l的45%环糊精溶液,并充分混合。然后加入3750 μ l的盐水,制备最终浓度为0.8333mg/ml的K252a。如实施例1所述,对动物(如实施例2所述获得)实施切开术,并评估静止痛。在手术后24小时测定“基线”累积静止痛。然后将K252a经i.p.以4mg/kg注射至实验动物中,而对照动物被注射了载体溶液(包含K252a溶液中除K252a外的全部组分)。在K252a或载体治疗后1小时(在图中标记为“1H-P-tmt”)和K252a或载体治疗后3小时(在图中标记为“3H-P-Tmt”),由不知晓治疗的实验者测定累积的静止痛评分。如图9所示,采用K252a的治疗在给药后3小时显著降低了静止痛($p < 0.005$),而采用载体的治疗未降低静止痛。这些结果证实了K252a治疗与抗NGF抗体治疗在相似的实验中以相同的程度降低了静止痛。

[0222] 实施例6

[0223] 对用抗NGF抗体或同种型匹配的对照抗体治疗的动物中手术后疼痛的比较

[0224] 为了显示抗NGF抗体的镇痛作用需要NGF的抑制,将抗NGF小鼠抗体911治疗手术后疼痛的功效与相同剂量的同种型匹配对照鼠抗体(具有对果蝇蛋白amnesiac的免疫反应性)的功效进行比较。按照实施例1实施实验,不同在于Sprague-Dawley大鼠购自Harlan(Wisconsin)。在手术前15小时,用1mg/kg抗NGF抗体911(在图中标记为“911”)或同种型匹配的抗amnesiac蛋白抗体(在图中标记为“amn ab”)经IP对大鼠进行治疗。手术后24小时,由不知晓动物治疗的观测者评估静止痛(累积的疼痛评分)。如图10所示,与用amnesiac蛋白抗体治疗的动物相比,采用抗NGF抗体911的治疗显著($p < 0.005$)降低了静止痛。这些结果证实了,采用抗NGF抗体治疗的镇痛作用是特异性的。

[0225] 虽然以上示例性说明和实施例按照便于清楚理解的目的对上述发明进行了某些描述,但说明书和实施例并非意在限制本发明的范围。

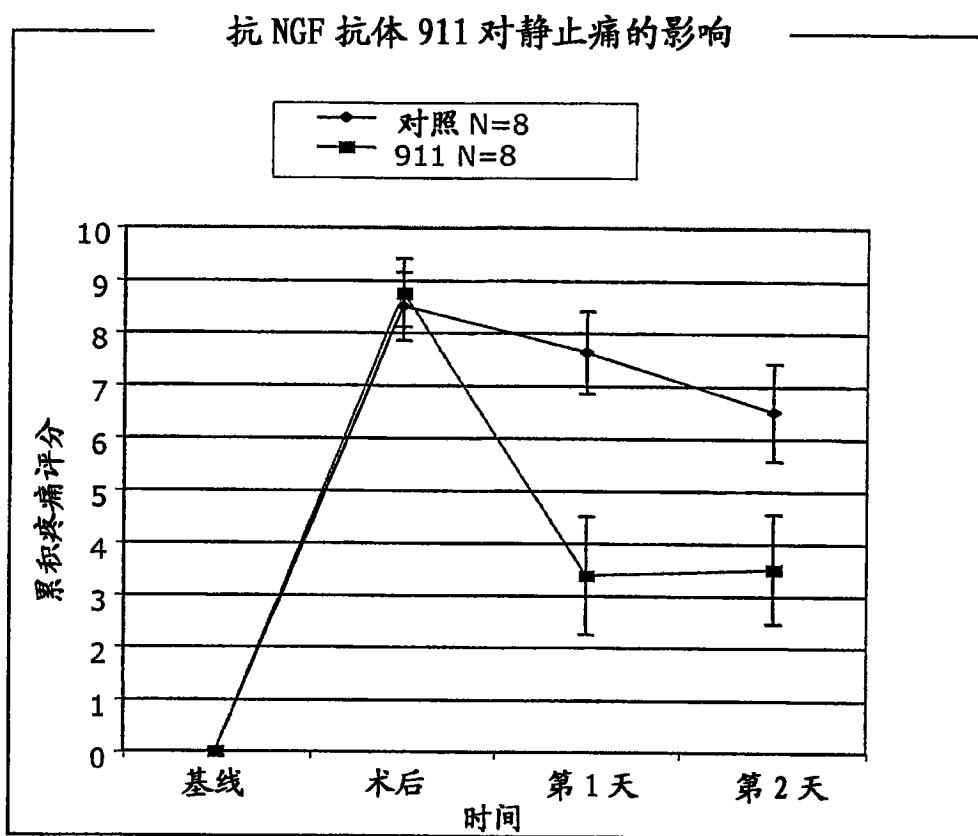


图 1

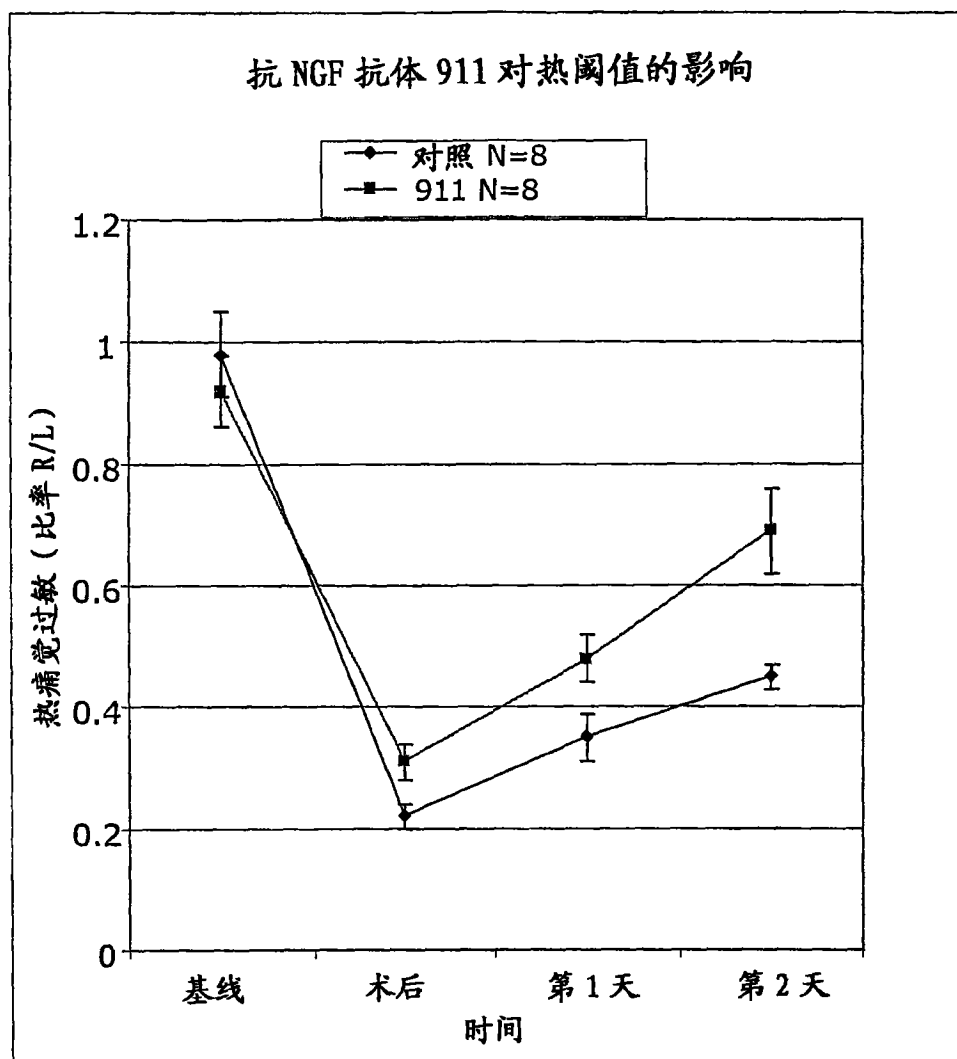


图 2

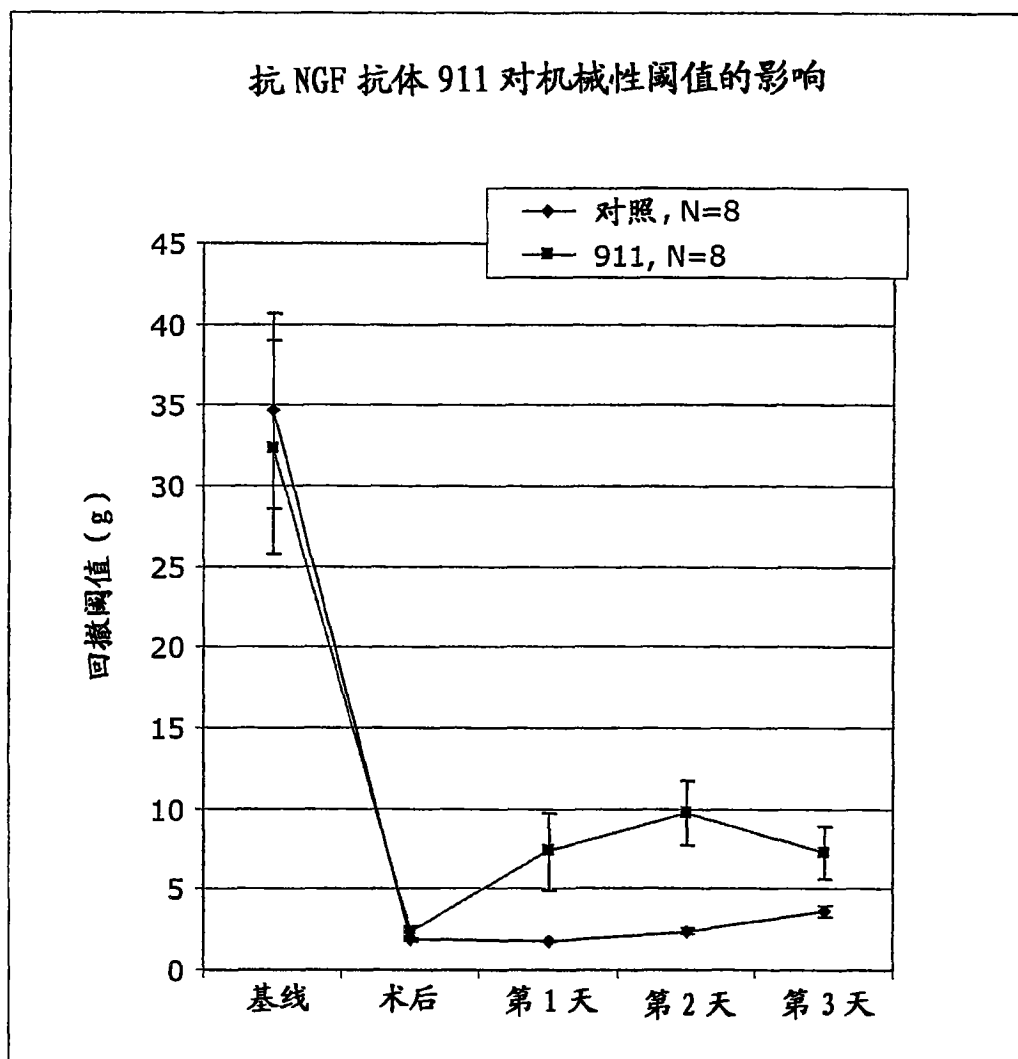


图 3

人源化抗 NGF 抗体 E3
改善手术后疼痛

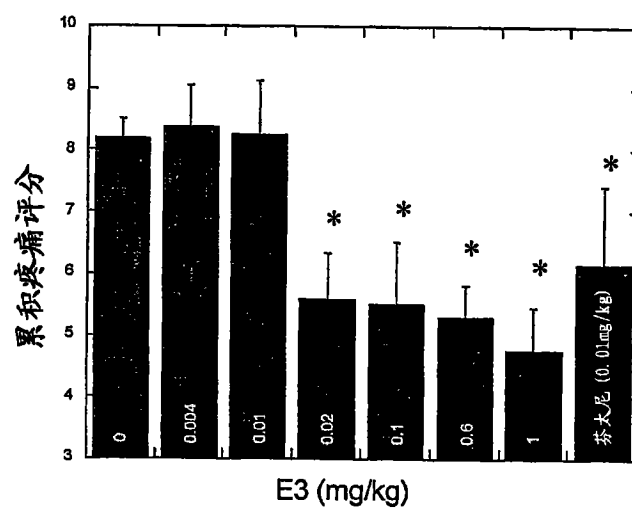


图 4

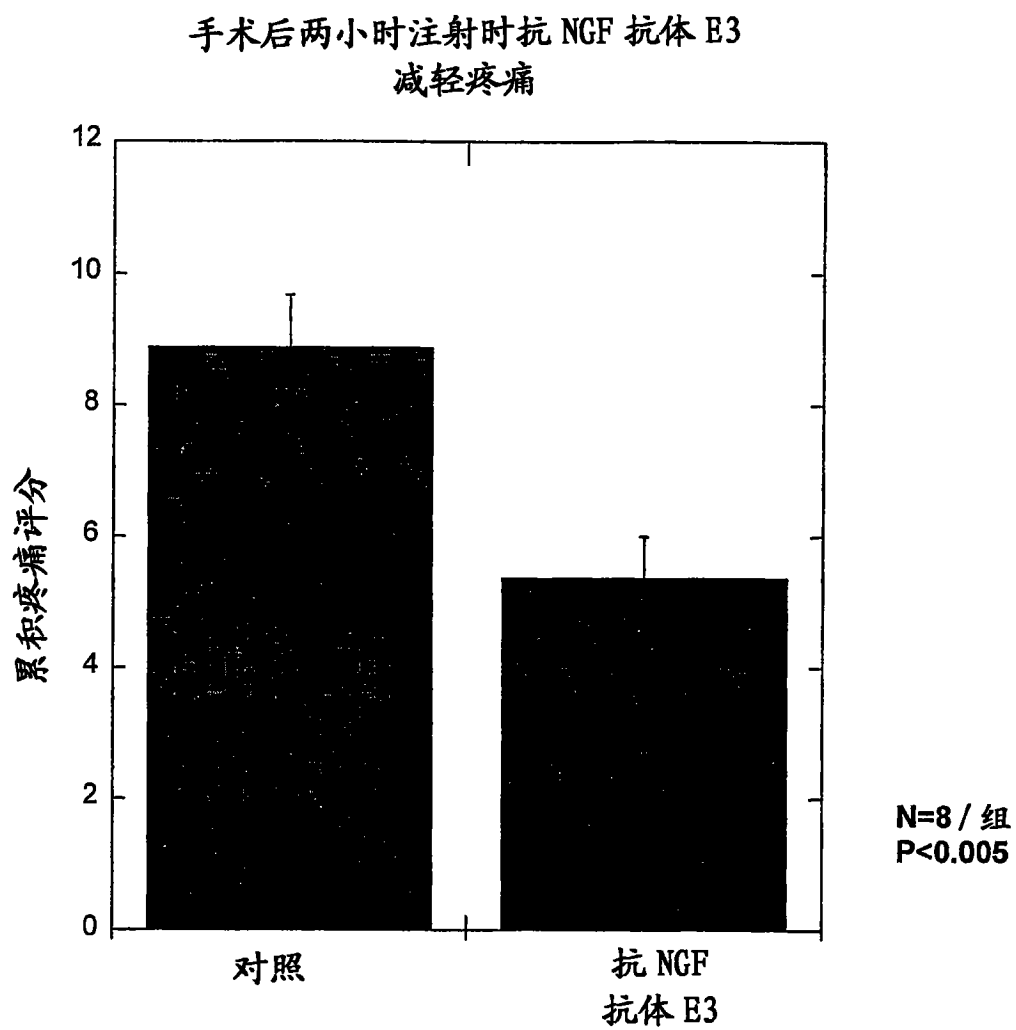


图 5

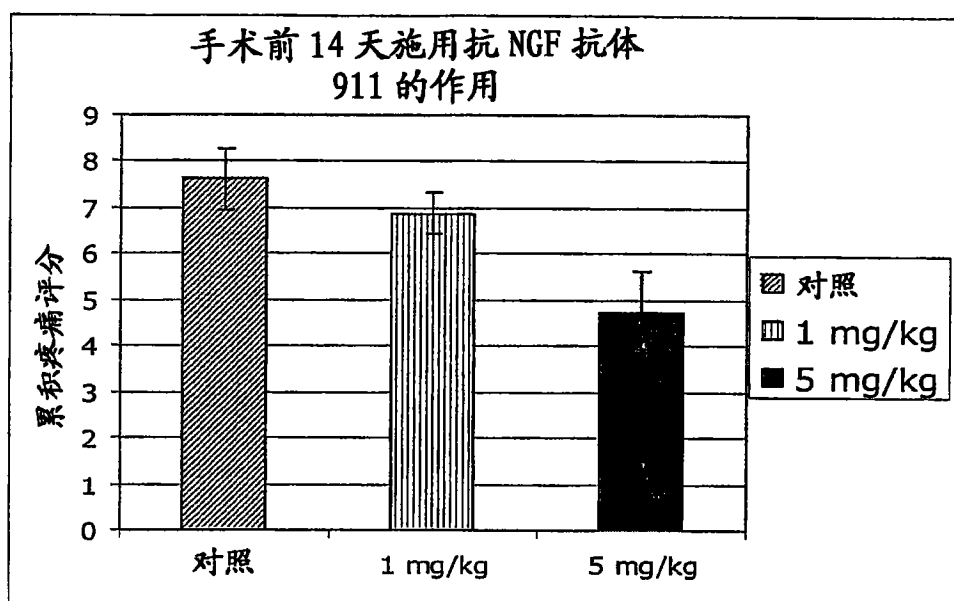


图 6

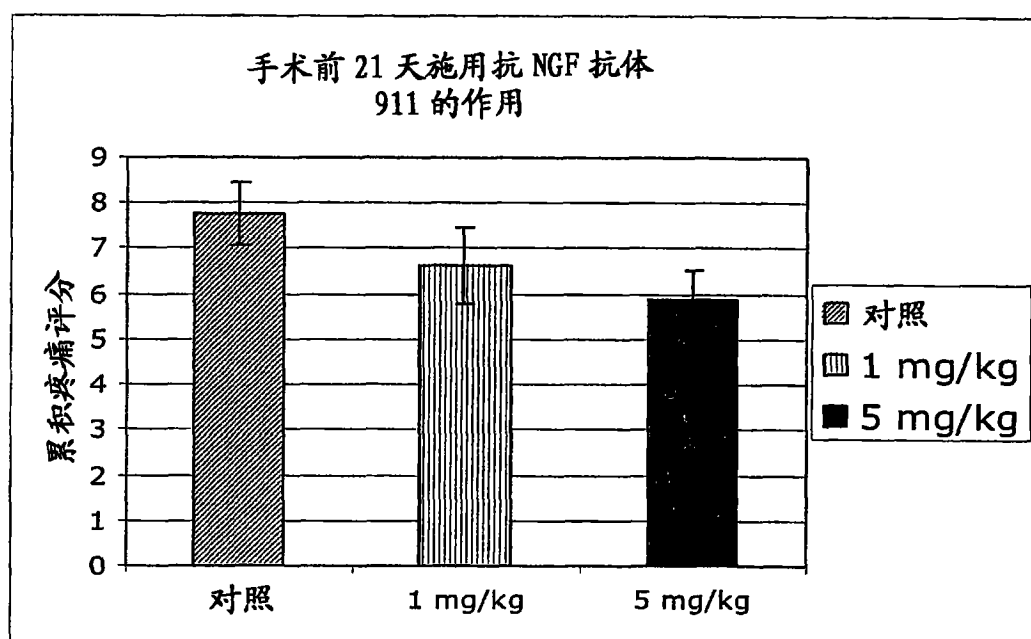


图 7

切割及用盐水、抗 NGF 抗体 911 或酮洛来克
治疗后完整伤口的比例

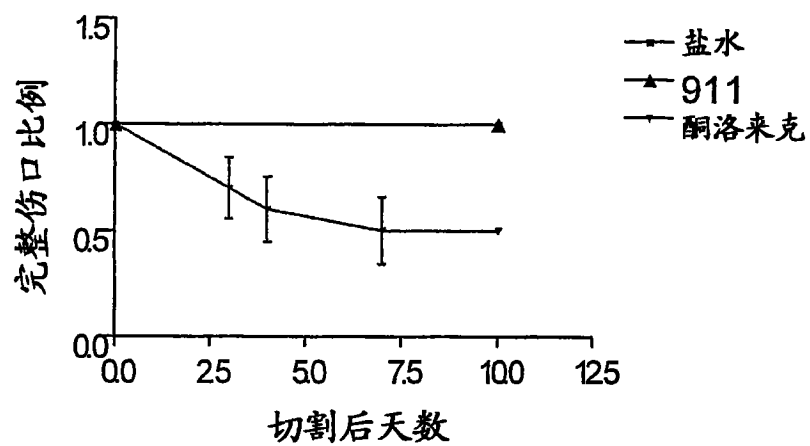


图 8

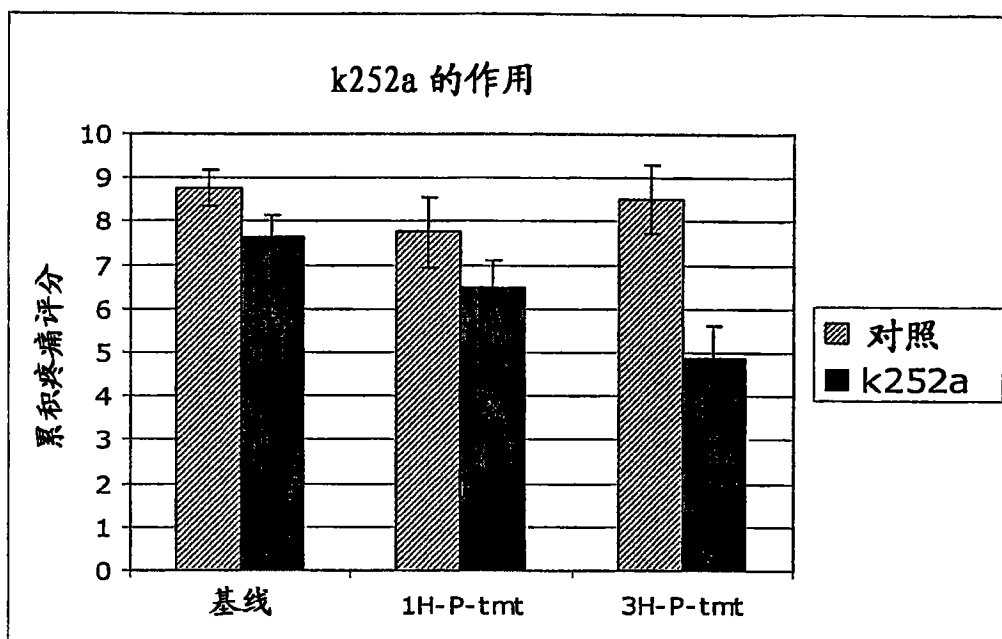


图 9

用抗 NGF 抗体治疗的镇痛
效果是特异性的

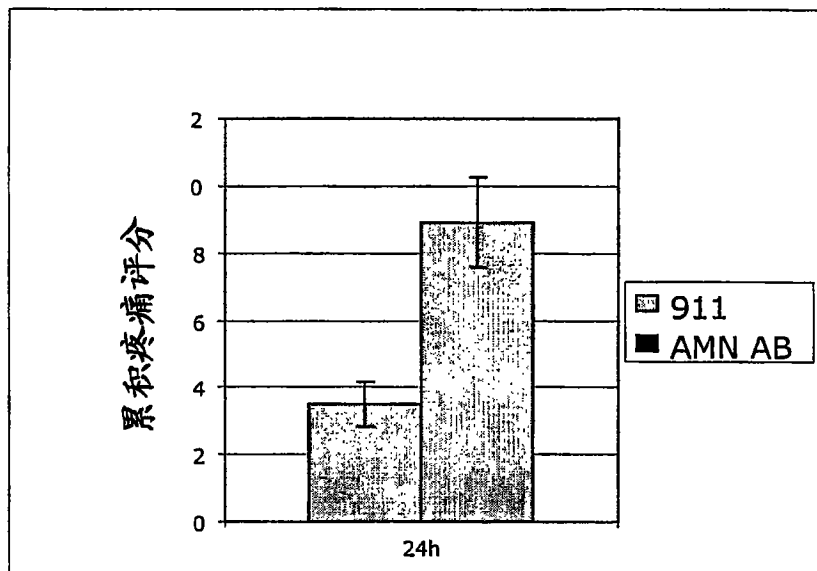


图 10