



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1878794 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 30

(21) 申请号 200380105337. 9

(22) 申请日 2003. 10. 08

(30) 优先权数据

60/417, 347 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/US2003/032113 2003. 10. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02004/096122 EN 2004. 11. 11

(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 黄草生 隗永良

(51) Int. Cl.

C07K 16/22 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 0178698 A2, 2001. 10. 25, 实施例.

US 6022875, 2000. 02. 08, 说明书第 2 栏, 第 3 栏.

张硕. 术后镇痛的临床应用. 首都医药 8 9. 2001, 8(9), 第 40 页.

审查员 唐慧

权利要求书 1 页 说明书 31 页 附图 2 页

(54) 发明名称

NGF 拮抗剂和阿片样药剂在治疗疼痛中的用途

(57) 摘要

本发明公开了治疗或预防疼痛的方法, 其包括施用一定量的神经生长因子拮抗剂和一定量的阿片样镇痛剂, 使二者联合能够提供有效的疼痛缓减。本发明还公开了包含神经生长因子拮抗剂和阿片样镇痛剂的组合物以及包含其的药盒。

1. 抗神经生长因子抗体和阿片样镇痛剂在制备治疗个体疼痛的药物中的用途,其中神经生长因子拮抗剂和阿片样镇痛剂联合提供有效的疼痛缓减。

2. 权利要求 1 的用途,其中阿片样镇痛剂选自吗啡、可待因、双氢可待因、二乙酰吗啡、氢可酮、氢吗啡酮、左啡烷、羟吗啡酮、阿芬太尼、丁丙诺啡、布托啡诺、芬太尼、舒芬太尼、哌替啶、美沙酮、纳布啡、丙氧芬和喷他佐辛。

3. 权利要求 2 的用途,其中阿片样镇痛剂是吗啡。

4. 权利要求 1 的用途,其中抗神经生长因子抗体结合人类神经生长因子。

5. 权利要求 4 的用途,其中抗神经生长因子抗体结合人类神经生长因子,亲和力为约 10nM 或小于约 10nM。

6. 权利要求 4 的用途,其中抗神经生长因子抗体结合人类神经生长因子,亲和力为约 0.1nM 或小于约 0.1nM。

7. 权利要求 1-6 中任一项的用途,其中抗神经生长因子抗体是人类抗体。

8. 权利要求 1-6 中任一项的用途,其中抗神经生长因子抗体是人源化抗体。

9. 权利要求 1 的用途,其中疼痛是手术后疼痛。

10. 权利要求 1 的用途,其中个体是人类。

11. 一种用于治疗个体疼痛的药物组合物,其包含抗神经生长因子抗体和药学上可接受的载体,其中所述药物组合物具有能够与阿片样镇痛剂同时或相继施用的性质。

12. 权利要求 11 的药物组合物,其中抗神经生长因子抗体结合人类神经生长因子。

13. 权利要求 12 的药物组合物,其中抗神经生长因子抗体结合人类神经生长因子,亲和力为约 10nM 或小于约 10nM。

14. 权利要求 12 的药物组合物,其中抗神经生长因子抗体结合人类神经生长因子,亲和力为约 0.1nM 或小于约 0.1nM。

15. 权利要求 11-14 中任一项的药物组合物,其中抗神经生长因子抗体是人类抗体。

16. 权利要求 11-14 中任一项的药物组合物,其中抗神经生长因子抗体是人源化抗体。

17. 一种用于治疗个体疼痛的药盒,其包含抗神经生长因子抗体,和同时或相继施用抗神经生长因子抗体和阿片样镇痛剂以有效治疗个体疼痛的说明书。

18. 权利要求 17 的药盒,其中抗神经生长因子抗体结合人类神经生长因子。

19. 权利要求 17 的药盒,其中抗神经生长因子抗体结合人类神经生长因子,亲和力为约 10nM 或小于约 10nM。

20. 权利要求 17 的药盒,其中抗神经生长因子抗体结合人类神经生长因子,亲和力为约 0.1nM 或小于约 0.1nM。

21. 权利要求 17-20 中任一项的药盒,其中抗神经生长因子抗体是人类抗体。

22. 权利要求 17-20 中任一项的药盒,其中抗神经生长因子抗体是人源化抗体。

23. 权利要求 11 的药物组合物,其中个体是人。

24. 权利要求 17 的药盒,其中个体是人。

NGF 拮抗剂和阿片样药剂在治疗疼痛中的用途

[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 60/417,347 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。

[0005] 发明领域

[0006] 本发明涉及通过施用神经生长因子拮抗剂与阿片样镇痛剂的组合预防或治疗患者中疼痛的方法和组合物。

[0007] 发明背景

[0008] 重度疼痛通常用阿片样镇痛剂治疗,但不幸的是其具有很多不良副作用,包括降低胃能动性,肾绞痛,精神混浊和呼吸抑制。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))。

[0009] 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))。

[0010] 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。

[0011] 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))。

[0012] 一致性地,外周组织中 NGF 水平增高与痛觉过敏及炎症相关,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))。

[0013] 治疗疼痛的药物疗法有两个一般类别,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及长期使用造成的肾毒性,第二类包括吗啡和相关阿片样药剂,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、精神混浊、肾绞痛、长期使用的耐受和成瘾危险。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。

[0014] 阿片样镇痛剂是一类良好确立的镇痛剂。它们有时也称作阿片剂。术语“阿片样药剂”(与“阿片样镇痛剂”互换使用)通常在一般意义上意指具有吗啡样活性的所有药物(天然或合成的)。合成和半合成的阿片样镇痛剂是五类化合物的衍生物:菲 (phenanthrene);苯基庚基胺;苯基哌啶;吗啡喃和苯并吗吩烷。这些化合物在药理学上具有不同的活性,有些是针对阿片样药剂受体的强激动剂(例如吗啡);其它的是中度至轻度激动剂(例如可待因);而其它的表现出混合的激动剂-拮抗剂活性(例如纳布啡);而其它的是部分激动剂(例如烯丙吗啡)。阿片样部分激动剂诸如烯丙吗啡(吗啡的 N-烷基类似物)可对吗啡的镇痛效应产生拮抗作用,当单独给药时,其凭借自身特性可以作为强效镇痛剂。

[0015] 在所有阿片样镇痛剂中,吗啡的应用最为广泛。不幸的是,除了其有用的治疗特性外,吗啡还具有大量副作用。另一不良特性是耐受性和躯体依赖性的形成,其限制了此类化合物的临床用途。因此,需要开发采用较低剂量的阿片样镇痛剂诸如吗啡的治疗方法,由此降低副作用的发生和耐受性和依赖性的可能性,从而避免与停止施用相关的药物戒断的主要问题。非常需要开发可以增强阿片样药剂的疼痛治疗的其它形式。

[0016] 本文所引用的所有参考文献,包括专利申请和出版物均全文引入作为参考。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明基于如下发现, NGF 的拮抗剂与阿片样镇痛剂组合能有效治疗疼痛。所述治疗通常能够使得剂量降低的阿片样镇痛剂产生相同量的疼痛降低效果和 / 或允许对阿片样药剂疼痛治疗的其它形式的增强。

[0019] 第一方面,本发明公开了治疗(或,在其它实施方案中,预防)疼痛的方法,包括施用一定量的神经生长因子拮抗剂和一定量的阿片样镇痛剂,以便通过联合两者提供有效的疼痛缓减。NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂的相对量和比例可有所变化。在某些实施方案中,施用足量的 NGF 拮抗剂以便将阿片样镇痛剂的正常剂量降低至少约 50%,所述阿片样镇痛

剂的正常剂量是产生相同程度的疼痛改善作用所需的量。在某些实施方案中,施用足量的 NGF 拮抗剂以便将实现相同程度的疼痛改善作用所需的阿片样镇痛剂的正常剂量降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%,或至少约 90%,或更高。

[0020] 另一方面,本发明提供了增强阿片样镇痛剂的疼痛治疗的方法,包括施用有效量的阿片样镇痛剂及有效量的 NGF 拮抗剂。如本文所使用的,联合施用包括同时施用和 / 或在不同的时间施用。联合施用还包括作为共制剂 (co-formulation) 施用 (即,NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂存在 (组合) 于同一组合物中) 和 / 或作为分开的组合物施用。如本文所使用的,“联合施用”意在包括将有效量的阿片样镇痛剂和 NGF 拮抗剂施用于个体的任何情况。如本文进一步所述,应当理解的是,NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂可以以不同的给药频率或间隔进行施用。例如,抗 NGF 抗体可每周施用,而阿片样镇痛剂可更频繁的施用。应当理解的是,NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂可采用相同的施用途径或不同的施用途径进行施用,而不同的给药方案可随着施用过程而改变。施用可在疼痛发作之前进行。

[0021] 另一方面,本发明提供了在个体中降低疼痛发生率、改善疼痛、缓解疼痛的方法;和 / 或延迟疼痛的发生或发展的方法,所述方法包括施用有效量的阿片样镇痛剂及有效量的 NGF 拮抗剂。

[0022] 本发明的方法适用于治疗或预防具有任何病因学的疼痛,包括通常采用阿片样镇痛剂治疗的疼痛,例如,胰腺炎、肾结石、头痛、dysmenorrhea、肌与骨骼的疼痛 (例如腰痛)、扭伤、内脏痛、卵巢囊肿、前列腺炎、膀胱炎、化学或热烧伤、或癌症 (诸如前列腺癌骨转移、乳腺癌骨转移、肺癌骨转移、胰腺癌)。

[0023] 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 TrkA 免疫粘合物。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,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。在其它实施方案中,抗 NGF 抗体识别人 NGF。在其它实施方案中,抗 NGF 抗体特异性地结合人 NGF。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 NGF (诸如 hNGF) 且不显著性结合相关神经生长蛋白,诸如 NT-3,NT4/5,和 / 或 BDNF。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。

[0024] 在某些实施方案中,NGF 拮抗剂结合 NGF 分子。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。但是,NGF 拮抗剂可以可选地结合 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 TrkA 受体的活化。

[0025] 抗 NGF 抗体对 NGF(诸如 hNGF) 的结合亲和力可以是约 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。

[0026] 在 NGF 拮抗剂是抗体的情况下,抗体可以是抗体片段,包括选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 片段的抗体片段、由抗体片段形成的 diabody、单链抗体分子和多特异性抗体,和单链 Fv(scFv) 分子。

[0027] 阿片样镇痛剂可以是表现出吗啡样生物活性的任何化合物。在某些实施方案中,阿片样镇痛剂是以下的一项或多项:吗啡、可待因、双氢可待因、二乙酰吗啡、氢可酮、氢吗啡酮、左啡烷、羟吗啡酮、阿芬太尼、丁丙诺啡、布托啡诺、芬太尼、舒芬太尼、哌替啶、美沙酮、纳布啡、丙氧芬和喷他佐辛;或其药学上可接受的盐。

[0028] NGF 拮抗剂和 / 或阿片样镇痛剂可借助任何适宜的途径施用于个体。例如,其可经口、静脉内、舌下、皮下、动脉内、肌肉内、经直肠、脊柱内、胸内、腹膜内、心室内、舌下、经皮或通过吸入而一同或分开,和 / 或同时和 / 或相继地进行施用。施用可以是全身性的(例如,静脉内)或局部性的。

[0029] 第二方面,本发明公开了包含神经生长因子拮抗剂和 / 或阿片样镇痛剂的组合物。神经生长因子拮抗剂和阿片样镇痛剂可一起与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂联合存在,或它们可以存在于分开的组合物中。另一方面,本发明提供了 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂的协同性组合物。

[0030] 第三方面,本发明公开了用于本文所述任何方法的药盒,所述药盒包括 NGF 拮抗

剂和 / 或阿片样镇痛剂。该药盒可进一步包括用于本文所述任何方法的说明书。该说明书可包括 NGF 拮抗剂与阿片样药剂的联合施用 (即,同时施用和 / 或在不同的时间施用)。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂被包装在一起,但它们可以在或不在相同的容器内。由此,在某些实施方案中,药盒包括存在于相同容器中的 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂,和用于本文所述任何方法的说明书。在其它实施方案中,药盒包括存在于分开的容器中的 NGF 拮抗剂和阿片样药剂。

附图简介

[0031] 图 1 显示了用吗啡联合 NGF 拮抗剂 (小鼠抗 NGF 抗体 911, Hongo, 等, Hybridoma 19 :215-227 (2000)) 进行治疗的动物中累积的疼痛评分降低。手术前单独用抗 NGF 抗体 (“911”) 以 0.3mg/kg 进行治疗比单独用 0.3mg/kg 吗啡进行治疗更有效地降低了静止痛 (resting pain), 而用抗 NGF 抗体联合吗啡进行治疗比单独用吗啡或单独用抗 NGF 抗体更有效地降低了静止痛。

[0032] 图 2 显示了用吗啡联合 NGF 拮抗剂 (抗 NGF 抗体 911) 进行治疗的动物中累积的疼痛评分降低。用抗 NGF 抗体加吗啡的治疗比单独用吗啡或单独用抗 NGF 抗体更有效地降低了静止痛。

[0033] 图 3 显示了手术和用抗 NGF 抗体和 / 或吗啡进行治疗后动物中观察到的静止痛评分。动物在手术前 15 小时用 NGF 拮抗剂 (抗 NGF 抗体 911) 进行治疗,在手术后一天检测疼痛行为。对动物进行无吗啡 (实线)、0.3mg/kg 吗啡 (虚线) 或 1.0mg/kg 吗啡 (点线) 的检测。与单独用 0.3mg/kg 吗啡进行治疗相比,0.3mg/kg 吗啡联合 0.3mg/kg 抗 NGF 抗体或 1mg/kg 抗 NGF 抗体进行的治疗显著改善了疼痛缓减 (即,静止痛降低)。此外,抗 NGF 抗体的单独治疗产生了与以 0.3mg/kg 给药的吗啡等价的疼痛缓减。用 1.0mg/kg 抗 NGF 抗体加 0.3mg/kg 吗啡的治疗产生至少等于单独使用 1mg/kg 吗啡所得的疼痛缓减。

[0034] 发明详述

[0035] 我们已经发现疼痛可通过施用有效量的 NGF 拮抗剂 (诸如抗 NGF 抗体) 及阿片样镇痛剂进行治疗或预防。本发明的方法和组合物可用于治疗或预防通常用阿片样镇痛剂进行治疗的疼痛。通过使用神经生长因子拮抗剂 联合阿片样镇痛剂,根据本发明,目前可以用较低剂量的阿片样镇痛剂来治疗疼痛,由此降低了与使用阿片样镇痛剂相关的副作用 (例如呼吸抑制、便秘、肾绞痛、恶心和呕吐,和耐受性和依赖性以及药物戒断相关问题) 的可能性。在某些实施方案中,施用足量的 NGF 拮抗剂以便将实现相同程度的疼痛改善作用所需的阿片样镇痛剂的正常剂量降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%,或至少约 90%,或更高。

[0036] 采用阿片样镇痛剂的疼痛治疗还可按本文所述,通过联合施用阿片样镇痛剂及 NGF 拮抗剂而得以增强。

[0037] 在一个方面中,本发明提供了治疗或预防个体 (包括哺乳动物,人类和非人类) 中疼痛的方法,包括联合施用有效量的 NGF 拮抗剂及有效量的阿片样镇痛剂。另一方面,本发明提供了增强阿片样镇痛剂治疗或预防个体中疼痛的方法,包括联合施用有效量的 NGF 拮抗剂 (诸如抗 NGF 抗体) 及有效量的阿片样镇痛剂。另一方面,本发明提供了预防、改善和 / 或防止疼痛的发展或进展的方法。

[0038] 在某些实施方案中,抗 NGF 抗体能结合 NGF 和有效抑制 NGF 与其 TrkA 和 / 或 p75 受体的体内结合,和 / 或有效抑制 NGF 激活其 TrkA 和 / 或 p75 受体。

[0039] 另一方面,本发明提供了改善、延迟疼痛的发生和 / 或防止疼痛的进展的方法。

[0040] 本发明的阿片样镇痛剂的实例包括(但不限于)吗啡、可待因、双氢可待因、二乙酰吗啡、氢可酮、氢吗啡酮、左啡烷、羟吗啡酮、阿芬太尼、丁丙诺啡、布托啡诺、芬太尼、舒芬太尼、哌替啶、美沙酮、纳布啡、丙氧芬和喷他佐辛;或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,阿片样镇痛剂是吗啡;或其药学上可接受的盐。

[0041] 本发明所用阿片样镇痛剂的盐的示例包括硫酸吗啡、盐酸吗啡、酒石酸吗啡、磷酸可待因、硫酸可待因、重酒石酸二氢可待因、盐酸二乙酰吗啡、重酒石酸氢可酮、盐酸氢吗啡酮、酒石酸左啡烷、盐酸羟吗啡酮、盐酸阿芬他尼、盐酸丁丙诺啡、酒石酸布托啡诺、枸橼酸芬太尼、盐酸哌替啶、盐酸美沙酮、盐酸纳布啡、盐酸丙氧芬、萘磺酸丙氧芬(2-萘磺酸(1:1)一水化物),和盐酸喷他佐辛。在一个实施方案中,阿片样镇痛剂是硫酸吗啡。

[0042] 本发明的方法和组合物可用于治疗具有任何病因学的疼痛,包括急性和慢性疼痛、具有炎性成分的任何疼痛,和通常用阿片样镇痛剂处方治疗的任何疼痛。疼痛的实例包括外科手术后疼痛(post-surgical pain)、处置后疼痛(post-operative pain)(包括牙痛)、偏头痛、头痛和三叉神经痛、与烧伤、伤口或肾结石相关的疼痛、与创伤(包括创伤性头损伤)相关的疼痛、神经性疼痛、与肌骨骼的病症,诸如类风湿性关节炎、骨性关节炎、胰腺炎、炎性肠病、强直性脊椎炎、血清阴性(非类风湿性)关节病、非关节性风湿病和关节周疾病相关的疼痛,以及与癌症相关的疼痛(包括“突发性疼痛”(break-through pain)和与终末期癌相关的疼痛)、周围神经病和疱疹后神经痛。具有炎性成分的疼痛的实例(除上述某些疾病外)包括风湿痛、与粘膜炎相关的疼痛,和痛经。在某些实施方案中,本发明的方法和组合物可用于治疗或预防手术后疼痛和癌症疼痛。

[0043] NGF 拮抗剂和 / 或阿片样镇痛剂可借助任何适宜的途径施用于个体。例如,其可经口、静脉内、舌下、皮下、动脉内、肌内、经直肠、脊柱内、胸内、腹膜内、心室内、舌下、经皮或通过吸入而一同或分开,和 / 或同时,和 / 或相继地进行施用。施用可以是全身性的(例如,静脉内)或局部性的。

[0044] 另一方面,本发明提供了治疗疼痛的组合物和药盒,其包括适用于本文所述任何方法的 NGF 拮抗剂(诸如抗 NGF 抗体、抗 NGF 单克隆抗体)和 / 或阿片样镇痛剂。在某些实施方案中,抗 NGF 抗体能有效抑制 NGF 结合其 TrkA 和 / 或 p75 受体和 / 或能有效抑制 NGF 激活其 TrkA 和 / 或 p75 受体。

[0045] 一般技术

[0046] 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)。

[0047] 定义

[0048] “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。免疫球蛋白有五个主要类型: 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。

[0049] “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)。

[0050] “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。

[0051] 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。

[0052] “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。

[0053] “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), 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。

[0054] 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。

[0055] “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。

[0056] 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; 和介导疼痛的能力。

[0057] 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。

[0058] 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: 改善或减轻疼痛, 包括急性、慢性、炎性、神经性或手术后的疼痛的任何方面。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: 减轻严重度, 减轻与疼痛 (包括疼痛的任何方

面)相关的一种或多种症状(诸如缩短疼痛持续期和/或降低疼痛敏感性或感觉)。

[0059] 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,在个体中延迟疼痛的发生或增加疼痛发生前的时间)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“降低个体中疼痛发生率的方法”反映的是基于如下的合理预期而联合施用本文所述的 NGF 拮抗剂及本文所述的阿片样镇痛剂,所述合理预期为所述施用可能会在特定个体中导致疼痛发生率降低的预期。

[0060] 疼痛或疼痛的一种或多种症状的“改善”是指与未联合施用 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂相比,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。

[0061] 疼痛或疼痛的一种或多种症状的“缓解”是指在用 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂根据本发明进行联合治疗的个体或个体群中,减轻疼痛的一种或多种不良临床表现的程度。

[0062] 如本文所使用的,“延迟”疼痛的发展是指延迟、阻碍、减缓、延缓、稳定和/或推迟疼痛的进展。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。

[0063] 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。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。本文所使用的疼痛的“发作”或“出现”包括初次发作和/或复发。

[0064] “有效量”是足以产生有益的或需要的临床结果的量,所述结果包括疼痛感觉的缓解或减轻。为了本发明的目的,NGF 拮抗剂和阿片样药剂的有效量包括这样的量,该量足以治疗、改善、减轻任何类型的疼痛的强度,包括急性、慢性、炎性、神经性或手术后疼痛的强度。在某些实施方案中,阿片样镇痛剂和 NGF 拮抗剂的有效量是这样的 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂的量,该量能够将对于外界刺激的敏感阈调节至可与健康个体中观测到的水平相当的水平。在其它实施方案中,该水平可不与健康个体中观测到的相当,但其与不接受联合治疗的情况相比而言降低。NGF 拮抗剂的有效量还包括足以增强疼痛的阿片样药剂治疗(疗效)(如本文所述)或降低疼痛治疗或预防所必需的阿片样药剂的剂量(如本文所述)的 NGF 拮抗剂的量。如本领域中所理解的,与阿片样药剂联合的 NGF 拮抗剂的有效量可根据,尤其是,疼痛类型(和患者病史以及其它因素诸如所使用的 NGF 拮抗剂和/或阿片样药剂的类型(和/或剂量)而变化。在本文中,有效量还可以是实现协同作用的 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂的量。在本发明文中,拮抗剂的有效量通常是指足以导致阿片样药剂对疼痛的治疗效果增强(其又可以意味着剂量降低和/或观察到某些其它有益效果)和/或导致与单独的阿片样药剂治疗相比而言的有益效果的量。NGF 拮抗剂的“有效量”还可导致与单独施用 NGF 拮抗剂或阿片样药剂相比而言的协同作用。在某些实施方案中,“有效量”是足以延迟疼痛发展的量。

[0065] “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、牛、犬、猫、小鼠和大鼠。

[0066] 术语“阿片样镇痛剂”是指具有吗啡样活性的所有药物(天然的或合成的)。合成和半合成的阿片样镇痛剂是五类化合物的衍生物:菲;苯基庚基胺;苯基哌啶;吗啡喃和苯并吗吩烷,所有这些均在该术语的范围之内。示例性阿片样镇痛剂包括可待因、双氢可待因、二乙酰吗啡、氢可酮、氢吗啡酮、左啡烷、羟吗啡酮、阿芬太尼、丁丙诺啡、布托啡诺、芬太尼、舒芬太尼、哌替啶、美沙酮、纳布啡、丙氧芬和喷他佐辛或其药学上可接受的盐。

[0067] 如本文所使用的,“联合”施用包括同时施用和/或在不同的时间施用。联合施用还包括以共制剂形式施用(即,NGF拮抗剂和阿片样药剂存在于同一组合物中)或以分开的组合物施用。如本文所使用的,联合施用意在包括将阿片样药剂和NGF拮抗剂施用于个体(其可同时和/或分开发生)的任何情况。如本文进一步所述,应当理解的是,NGF拮抗剂和阿片样药剂可以以不同的剂量频率或间隔进行施用。例如,抗NGF抗体可每周施用,而阿片样药剂可更频繁的施用。应当理解的是,NGF拮抗剂和阿片样镇痛剂可采用相同的施用途径或不同的施用途径进行施用。

[0068] “手术后疼痛”(post-surgical pain)(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(引进或导致)的疼痛。在某些实施方案中,手术后疼痛为内部或外部(包括外周的)的疼痛,而损伤、切割伤、创伤、撕裂或切割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。

[0069] 当阿片样药剂治疗的一个方面被改善时(与施用阿片样药剂而不施用NGF拮抗剂时相比较),疼痛的阿片样药剂治疗被“增强”。例如,相对于不存在NGF拮抗剂时的阿片样镇痛剂的疗效,疼痛的阿片样药剂治疗效果可在存在NGF拮抗剂的情况下得到提高。作为另一实例,可通过联合施用NGF拮抗剂及阿片样镇痛剂,“增强”阿片样药剂对疼痛的治疗或预防,所述联合施用能更好地缓解疼痛(例如,当所使用的阿片样药剂的剂量不能有效治疗或预防疼痛时)。

[0070] 本发明的方法

[0071] 本文所公开的所有方法中涉及NGF拮抗剂和阿片样镇痛剂时,也包括包含这些药剂之一或多种的组合物。本发明可用于治疗个体(包括所有哺乳动物,人类和非人类)中疼痛。

[0072] 在一个方面中,本发明提供了在个体中治疗疼痛的方法,其包括联合施用有效量的NGF拮抗剂及有效量的阿片样镇痛剂。在某些实施方案中,施用足量的NGF拮抗剂以便将实现相同程度的疼痛改善作用所需的阿片样镇痛剂的正常剂量降低至少约5%、至少约

10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%，或至少约 90%，或更高。

[0073] 另一方面，本发明提供了在个体中增强阿片样镇痛剂的疼痛治疗的方法，其包括联合施用有效量的 NGF 拮抗剂和有效量的阿片样镇痛剂。

[0074] 在某些实施方案中，疼痛包括以下任何一项或多项：急性和 / 或慢性疼痛、具有炎症成分的任何疼痛、外科手术后疼痛、处置后疼痛（包括牙痛）、偏头痛、头痛和三叉神经痛、与烧伤、伤口或肾结石相关的疼痛、与创伤（包括创伤性头损伤）相关的疼痛、神经性疼痛、和与癌症相关的疼痛（包括“突发性”痛和与终末期癌相关的疼痛）。在其它实施方案中，疼痛是通常用阿片样镇痛剂（诸如吗啡）治疗的任何疼痛，例如，胰腺炎、肾结石、头痛、痛经、肌与骨骼的疼痛（例如腰痛）、扭伤、内脏痛、卵巢囊肿、前列腺炎、膀胱炎、化学或热烧伤、癌症（诸如前列腺癌骨转移、乳癌骨转移、肺癌骨转移、胰腺癌）。

[0075] 另一方面，本发明提供了预防、改善和 / 或防止疼痛的发展或进展的方法。由此，在某些实施方案中，在疼痛事件（诸如手术）之前施用 NGF 拮抗剂（诸如抗 NGF 抗体）和 / 或阿片样镇痛剂。例如，可在可能导致疼痛的活动或有危险导致疼痛的活动（诸如外伤或手术）前 30 分钟、1 小时、5 小时、10 小时、15 小时、24 小时或甚至更长时间，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。

[0076] 对疼痛的治疗或预防的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。

[0077] 应当理解的是，当联合施用 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂时（以单一或以分开的组合物），神经生长因子拮抗剂和阿片样镇痛剂的比例将与表现出期望效应相一致。在某些实施方案中，该比例按神经生长因子拮抗剂对阿片样镇痛剂的重量计，为大约 1 : 1。在某些实施方案中，该比例可以是约 0.001 : 约 1 至约 1000 : 约 1，或约 0.01 : 约 1 至约 100 : 约 1。其它比例也是可预期的。

[0078] 应当理解的是，神经生长因子 (NGF) 拮抗剂和阿片样镇痛剂用于治疗或预防疼痛所需要的量不仅会随着具体所选的化合物或组合物变化，还会随着施用途径、要治疗的病症的性质和患者的年龄和状态而变化，其最终取决于主治医师的判断。

[0079] NGF 拮抗剂

[0080] 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 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。

[0081] 抗 NGF 抗体

[0082] 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) 预防或治疗疼痛的任何方面，特别是在与阿片样镇痛剂联合的情况下；(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) 增强疼痛的阿片样药剂治疗。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 表 1：重链可变区

[0086] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTI SKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWGQGLTVTVS (SEQ ID NO :1)。

[0087] 表 2：轻链可变区

[0088] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGT DFTFTISLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO :2)。

[0089] 编码 E3 重链可变区或 E3 轻链可变区的下列多核苷酸于 2003 年 1 月 8 日保藏于 ATCC。

[0090]

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

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 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。在一些实施方案中,结合亲和力是约 2pM、约 5pM、约 10pM、约 15pM、约 20pM、约 40pM 或大于约 40pM。而一个实施方案中,结合亲和力为约 2pM-22pM。在其它实施方案中,结合亲和力小于约 100nM,约 50nM,约 10nM,约 1nM,约 500pM,约 100pM,约 50pM,约 10pM。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 的任一项至约 2pM、约 5pM、约 10pM、约 15pM、约 20pM 或约 40pM 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 的任一项,或小于约 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。

[0095] 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 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, pH7.4, 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 KD)以 100 μ L/分钟注射 1 分钟,允许多达 2 小时的解离时间。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

[0096] 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的 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。

[0097] 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)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。

[0098] 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-variableregion)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。

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] 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,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。

[0103] 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。

[0104] 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)。

[0105] 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。

[0106] 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。

[0107] 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 区及其相关互补决定区(CDRs)的嵌合抗体。参见,例如,Winter 等, *Nature*

[0108] 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 519596。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。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。

[0109] 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™。

[0110] 显而易见的是,虽然上述内容涉及人源化抗体,但所公开的一般原理也适用于定制抗体而用于,例如,犬、猫、灵长类、马和牛中。此外显而易见的是,本文所述抗体人源化的一个或多个方面可与,例如 CDR 移植、构架突变和 CDR 突变联合。

[0111] 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噤唑酮抗体。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区基因天然突变体库(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申请序号WO 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。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。

[0112] 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。

[0113] 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。

[0114] 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。

[0115] 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。

[0116] 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,或可以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。

[0117] 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 MAb 911, 912, 938, 如 Hongo 等, Hybridoma 19:215-227(2000) 中所述。

[0118] 其它 NGF 拮抗剂

[0119] 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>。

[0120] 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。

[0121] 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。参见 <http://www.macalester.edu/~montgomery/RNAi.html> ;

[0122] <http://pub32.ezboard.com/fmorpholinosfrml9.showMessage?topicID=6.topic> ;<http://www.highveld.com/ribozyme.html>。

[0123] 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) 特别是与阿片样镇痛剂联合,预防或治疗疼痛的任何方面;(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) 增强阿片剂的疼痛治疗。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/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 W002/20479 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。

[0124] 在某些实施方案中,NGF 抑制性化合物结合 NGF。靶向(结合)的实例性位点包括,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。靶向的实例性位点包括 TrkA 和 / 或 p75 中结合 NGF 的那些部分。

[0125] 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、鞘内、心室内、经口、经肠、肠胃外、鼻内或经皮。一些实施方案中,当 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。

[0126] 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。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 WO 89/09225 中所述源于 NGF 的肽。适宜的 NGF 结构类似物还可通过对 NGF- 受体结合进行分子模建, 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, 以便得到提高的亲合力和生物效应。

[0127] 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 后不具有受体 (例如 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、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, 及局部施用。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。

[0128] 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, *JBiol 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 (或更多) DNA 的量局部施用。在某些实施方案中, 在基因治疗过程期间还可施用小于约 500ng、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 或更高的浓度范围。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 Therapy* (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。

[0129] 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 0 345 242), 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。

[0130] 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。

[0131] 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。

[0132] 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 (或其部分) 和免疫球蛋白序列, 其保留了 TrkA 受体的结合特异性 (在一些实施方案中, 基本上保留了 trkA 受体的结合特异性), 且能结合 NGF。TrkA 免疫粘合素能够阻滞 (降低和 / 或抑制) NGF 生物活性, 如本文所述。

[0133] TrkA 免疫粘合素是本领域中已知的, 且已发现其能阻滞 (降低或抑制) NGF 与 TrkA 受体的结合。参见, 例如, 美国专利序号 6, 153, 189。一个实施方案中, TrkA 免疫粘合素包括能够结合 NGF 的 TrkA 受体氨基酸 序列 (或基本上保留了 trkA 受体的结合特异性的氨基酸序列) 和免疫球蛋白序列 (或基本上保留了 trkA 受体的结合特异性的氨基酸) 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。

[0134] 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。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 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。

[0138] NGF 拮抗剂的鉴定

[0139] 采用本领域已知的方法,可对抗 NGF 抗体和其它 NGF 拮抗剂进行鉴定和特征描述,其中由所述已知方法可检测和 / 或测定 NGF 生物活性的降低、改善或中和。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。

[0140] 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。

[0141] 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) 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) 特别是与阿片样镇痛剂联合,预防、改善或治疗疼痛的任何方面;(f) 抑制(减少)NGF 合成、生成或释放;(g) 增强疼痛的阿片样药剂治疗。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。

[0142] 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)。

[0143] 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。

[0144] 组合物

[0145] 本发明的组合物包含有效量的 NGF 拮抗剂(诸如抗 NGF 抗体)和/或阿片样镇痛剂,如本文多种实施方案中所述。在某些实施方案中,该组合物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(诸如治疗手术后疼痛的方法)。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。NGF 拮抗剂和阿片样药剂可存在于单一组合物中,或是分开的组合物中。由此,在某些实施方案中,NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂存在于相同组合物中。在其它实施方案中,NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂存在于分开的组合物中。

[0146] 在另一方面中,本发明提供了 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂的协同性组合物。

[0147] 在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗疼痛(诸如手术后疼痛)的包含 NGF 拮抗剂的药物组合物,其中所述使用包括同时和/或相继施用阿片样镇痛剂。在某些实施

方案中,本发明提供了用于治疗疼痛的包含阿片样镇痛剂的药物组合物,其中所述使用包括同时和 / 或相继施用 NGF 拮抗剂。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗疼痛的、包含以分开、同时和 / 或相继方式施用的 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂的药物组合物。在某些实施方案中,NGF 拮抗剂是抗 NGF 抗体(诸如本文所述的抗体 E3)。在其它实施方案中,阿片样镇痛剂是吗啡。而在其它实施方案中,NGF 拮抗剂是抗 NGF 抗体而阿片样镇痛剂是吗啡。

[0148] 应当理解的是,组合物可包含一种以上 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一种以上识别相同表位的抗 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。在其它实施方案中,组合物包含一种或多种选自以下的 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 受体或 p75 受体)的拮抗剂,和 / 或降低(阻碍和 / 或阻滞)下游 NGF 受体信号的拮抗剂。

[0149] 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(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。

[0150] 本文所述的组合物可包括已知可用于治疗疼痛的其它化合物。NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂,及其组合物还可以与增强和 / 或补充药剂的功效的其它药剂联合使用。

[0151] 药盒

[0152] 本发明还提供了用于本发明方法的药盒。本发明的药盒包括一个或多个包含 NGF 拮抗剂(诸如抗 NGF 抗体,诸如本文所述的人源化抗体 E3)和 / 或阿片样镇痛剂的容器,而在某些实施方案中,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,药盒包括抗 NGF 抗体(诸如本文所述的抗体 E3)。在其它实施方案中,药盒包括抗 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)。药盒还可包括根据鉴别个体是否具有疼痛或个体是否有发生疼痛的危险而选择适用于治疗的个体的说明书。在某些实施方案中,本发明提供了用于本发明所述任何方法的药盒,所述药盒包括 NGF 拮抗剂。而在其它实施方案中,药盒包含抗体(诸如本文所述的抗体 E3)。而在其它实施方案中,说明书包括关于联合施用 NGF 拮抗剂及阿片样镇痛剂来治疗、预防和 / 或改善任何疼痛(诸如手术后疼痛)的说明。

[0153] 在某些实施方案中,药盒包括 NGF 拮抗剂(诸如抗 NGF 抗体),阿片样镇痛剂,和同时和 / 或相继施用 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂以有效治疗疼痛的说明书。在另一实施方案中,药盒包括 NGF 拮抗剂(诸如抗 NGF 抗体),和同时和 / 或相继施用 NGF 抗体和阿片样镇痛剂以有效治疗疼痛的说明书。在其它实施方案中,药盒包括 NGF 拮抗剂(诸如抗 NGF 抗体),和阿片样镇痛剂(诸如吗啡),和分开、同时和 / 或相继施用 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂以有效治疗疼痛的说明书。

[0154] 在某些实施方案中,药盒包括抗 NGF 抗体。在其它实施方案中,抗 NGF 抗体是包含表 1 中所示重链可变区和表 2 中所示轻链可变区的抗体。而在其它实施方案中,抗 NGF 抗体是本文所述的抗体 E3。

[0155] NGF 拮抗剂(诸如抗 NGF 抗体)和阿片样镇痛剂可存在于分开的容器中或在单个容器中。应当理解,药盒可包括独立的一种组合物或两种或多种组合物(其中一种组合物包括 NGF 拮抗剂而一种组合物包括阿片样镇痛剂)。

[0156] 本发明的药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。药盒可任选地提供其它组分诸如缓冲液和说明信息。

[0157] 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。本发明的药盒中提供的说明书通常是写于标签或包装插入物(例如,药盒包含的纸片)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。

[0158] 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。

[0159] 本发明的药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。药盒可具有无菌入口(例如容器可以是静脉内给药溶液袋或瓶,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内给药溶液袋或瓶,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。

[0160] 药盒可任选地提供其它组分诸如缓冲液和说明信息。通常,药盒包括容器和容器上的或与之连接的标签或包装插入物。

[0161] NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂的施用和治疗评估

[0162] NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂可借助任何适宜的途径施用于个体。例如,其可经口、静脉内、舌下、皮下、动脉内、肌内、经直肠、脊柱内、胸内、腹膜内、心室内、舌下、透皮或通过吸入而一同或分开进行施用。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、咀嚼胶、棒棒糖(lollipop)、栓剂等形式进行施用。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。

[0163] 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,推注或经一段时间连续输注,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。

[0164] 位点特异性的或靶向的局部递送技术也可用于施用。位点特异性的或靶向的局部递送技术的实例包括各种NGF拮抗剂和/或阿片样镇痛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，使用患者自控镇痛(PCA)技术或装置和/或直接施用。参见例如，PCT公开序号WO 00/53211和美国专利公开序号5,981,568。

[0165] 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。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)。

[0166] 在某些实施方案中，NGF拮抗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。剂量方案（包括使用的NGF拮抗剂）可随时间改变。

[0167] 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。在某些实施方案中，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为约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，1-4次每周的剂量是可以预期的。其它剂量方案包括不超过1次/日，1-4次/周，或更低频率的方案。在某些实施方案中，化合物可按约1次/周，约1-4次/月施用。本文中公开了抗NGF抗体的剂量。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。

[0168] 在某些实施方案中，当NGF拮抗剂不是抗体时，根据本发明的NGF拮抗剂可（在某些实施方案中）按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。在某些正常体重的成年患者中，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，将取决于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）。

[0169] 阿片样镇痛剂的施用剂量水平可以是不超过用于此类镇痛剂的常规剂量水平的

剂量水平。在某些实施方案中,阿片样镇痛剂以降低的水平施用。适宜的剂量水平要根据所选阿片样镇痛剂的镇痛效果而定,但典型的适宜水平是约 0.001-25mg/kg/日,约 0.005-10mg/kg/日,或约 0.05-1mg/kg/日,或更低。化合物的给药方案可以是多达 6 次/日(或更多),1-4 次/日,或其可以以更低的频率施用。在某些实施方案中,连续地,或非常频繁地(如使用 PCA)施用阿片样镇痛剂。

[0170] 当联合施用时(以单一或以分开的组合物),神经生长因子拮抗剂和阿片样镇痛剂的比例将与表现出期望的效应相一致。在某些实施方案中,该比例按神经生长因子拮抗剂对阿片样镇痛剂的重量计,为大约 1 : 1。在某些实施方案中,该比例可以是约 0.001 : 约 1 至约 1000 : 约 1,或约 0.01 : 约 1 至 100 : 约 1。其它比例也是可预期的。

[0171] 应当理解的是,神经生长因子拮抗剂和阿片样镇痛剂用于治疗或预防疼痛所需要的量不仅会随着具体所选的化合物或组合物而变化,还会随着施用途径、要治疗的病症的性质和患者的年龄和状态、治疗过程或阶段而变化,其最终取决于主治医师的判断。例如,NGF 拮抗剂(例如抗 NGF 抗体)的适宜剂量取决于施用的 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。

[0172] 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 拮抗剂和/或阿片样镇痛剂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。

[0173] 在一个实施方案中,在已一或多次接受 NGF 拮抗剂施用以治疗疼痛的个体中可以经验性地确定 NGF 拮抗剂的剂量。联合阿片样镇痛剂,给予个体递增剂量的 NGF 拮抗剂(例如,抗 NGF 抗体)。为了评估治疗的功效,可跟踪疼痛的指征。

[0174] 根据本发明的方法施用 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛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;疼痛发生之前和之后;期间和之后;之前和期间;或之前、期间和之后。例如,施用可以是在损伤、切割、创伤、手术和其它任何可能引起疼痛的事件之前、期间和/或之后。

[0175] 在某些实施方案中,可存在一种以上 NGF 拮抗剂,诸如抗体。这些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、至少五种或更多种不同的 NGF 拮抗剂。一般而言,所述 NGF 拮抗剂具有彼此间无不利影响的互补活性。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。

[0176] 在某些实施方案中,可存在一种以上阿片样镇痛剂。这些阿片样镇痛剂彼此间可以是相同或不同的。可存在至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种或更多种不同的阿片样镇痛剂。通常,这些阿片样镇痛剂具有不会彼此发生不良影响的互补活性。阿片样镇痛剂还可与能够增强和/或互补药剂效能的其它药剂联合使用。

[0177] 根据本发明所使用的 NGF 拮抗剂（诸如抗体）和阿片样镇痛剂的治疗性制剂可通过将具有所需纯度的抗体与任选的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. 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；对羟苯甲酸烷基酯诸如对羟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）。

[0178] 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。

[0179] 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。

[0180] 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。

[0181] 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）。

[0182] 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。

[0183] 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,其中包含约 0.01mg- 约 0.1mg-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。

[0184] 本发明的组合物可掺入用于经口或注射给药的液体形式中,该液体形式包括水溶液、适当调味的糖浆剂、水性或油性混悬剂,和采用食用油诸如棉子油、芝麻油、椰子油或花生油的调味乳剂,以及酞剂和相似的药学载体。适用于水性悬浮液的分散剂或悬浮剂包括合成和天然的树胶诸如西黄蓍胶、阿拉伯胶、藻酸盐、右旋糖酐、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或明胶。活性成分还可被掺入高粘性的控释产品诸如蔗糖醋酸异丁酯或其它产品中。这些制剂可被用于口服给药或注射。该注射可导致药物的局部贮存,其可在 1 日至 3 个月的时期内在局部释放。

[0185] 用于经注射给药的组合物包括含有 NGF 拮抗剂和阿片样镇痛剂作为 活性成分以及表面活性剂 (或湿润剂或表面活性剂) 或乳剂形式 (如油包水或水包油乳剂) 的那些组合物。

[0186] 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% 或 0.1-2.5% 的表面活性剂。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。

[0187] 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。

[0188] 一些实施方案中,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。

[0189] 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。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施用 (包括经口或经鼻)。

[0190] 治疗效果可通过本领域众所周知的方法进行评估。

[0191] 以下实施例用于例举说明而并非限制本发明。

实施例

[0192] 实施例 1

[0193] 抗 NGF 单克隆抗体联合阿片样镇痛剂用于治疗手术后疼痛

[0194] 我们采用模拟手术后疼痛的疼痛模型来评估抗 NGF 抗体联合阿片样镇痛剂（吗啡）的功效。每一实验包括 16 只动物（ $n = 8/\text{组}$ ）。

[0195] 动物。对于每一实验而言，在使用前，于正常光照条件下，舍养 16 只体重为 200–220g 的雄性成年 Sprague Dawley 大鼠（Harlan ;Indianapolis, IN）至少一周，食物和水随意取用。

[0196] 在手术前一日，将大鼠于实验笼中适应 2 小时后，将大鼠分为两组：一组在手术前 15 小时接受抗体，另一组在该时刻接受载体（5%葡萄糖 /0.45%盐水 USP）。将抗 NGF 拮抗剂抗体 Mab 911（参见 Hongo, 等, Hybridoma 19 :215–227 (2000)）以 0.3–20mg/kg 的浓度经腹膜内（i. p.）给药。手术后 24 小时，将 0.1、0.3、1 和 3mg/kg 多种浓度的硫酸吗啡经皮下（s. c.）给予所有动物。没有动物接受多于两种不同的吗啡剂量，这些剂量相隔至少两小时，较大的剂量总是在第二次给予。例如，在典型的实验中，半数动物在手术前 15 小时经腹膜内（i. p.）接受抗 NGF 抗体剂量，在动物的一只后爪上实施手术，并留置恢复。手术后 22 时，检测大鼠的“基线”静止痛，两小时后给予较低剂量的吗啡（通常是 0.3mg/kg）。给予吗啡剂量后 30 分钟，如前检测静止痛，给予初始吗啡剂量后两小时，给予较高剂量（通常是 1.0mg/kg）。再经过 30 分钟后，按下述再次检测静止痛。

[0197] 根据 Brennan, 等, Pain 64 :493–501 (1996) 所公开的步骤实施手术。用 2%异氟烷和空气混合物麻醉动物，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 中心纵向切口，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。在起端（origin）和止端（insertion）之间，将肌肉最大深度切开。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 黑色单股缝线线（ethilon））闭合伤口。这些缝合打结 5–6 次，第一个结松扎。用杆菌肽溶液擦洗伤口点。行为试验开始前，允许动物恢复，将其静置于干净笼中至少两小时。

[0198] 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。20 分钟适应期后，以 0–2 级评估承重。如果爪变白或挤压在网上则评分为 0，这提示承受全部体重。如果爪偏向于仅以皮肤接触网，而没有皮肤变白或皮肤凹痕，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 小时对所有动物进行测验。承重与动物愿意使用肢体的程度优良相关，由此是对疼痛缓减的有效测量。

[0199] 以下方法步骤被用于图 1、2 和 3 中所述实验。将动物分为两组（对照组和抗体治疗组）。在手术前 15 小时，将小鼠抗 NGF 抗体 Mab 911（Hongo 等，如上）经腹膜内施用（0.3mg/kg 体重和 / 或 1mg/kg 体重，依据试验而定）。对照动物不接受抗体，而接受 0mg/kg, 0.3mg/kg, 或 1mg/kg 吗啡，如本文所述。按照上述实施手术，于手术后 22 小时在两组中

评估静止痛（“基线”）。手术后 24 小时，用吗啡以 0.3mg/kg 处理所有动物，在吗啡处理后 30 分钟开始评估静止痛。在手术后 26 小时再给予 1.0mg/kg 的吗啡，然后在该最后吗啡剂量后 30 分钟开始再次评估静止痛。所有的吗啡处理均通过皮下（动物的颈背下）实施。这些实验的结果如图 1、2 和 3 中所示。

[0200] 图 1 显示了在接受 0.3mg/kg 抗 NGF 抗体 911 和 0、0.3mg/kg 体重或 1.0mg/kg 体重吗啡的动物中检测的静止痛评分。该实验证实了：与仅用吗啡或仅用抗 NGF 抗体进行治疗相比，用吗啡联合抗 NGF 抗体（抗 NGF 抗体 911）治疗的动物中累积的疼痛评分降低。因此，抗 NGF 抗体治疗联合吗啡治疗比仅用吗啡或仅用抗 NGF 抗体能更有效地降低静止痛。这些结果还显示出在手术前仅用 NGF 拮抗剂以 0.3mg/kg 进行治疗比仅用吗啡以 0.3mg/kg 进行治疗能更有效地降低静止痛。

[0201] 图 2 显示了在接受 1.0mg/kg 抗 NGF 抗体 911 和 0、0.3mg/kg 体重或 1mg/kg 体重吗啡的动物中检测的静止痛评分。这些结果证实了与仅用抗 NGF 抗体或仅用吗啡进行治疗相比，用吗啡联合抗 NGF 抗体治疗的动物中累积的疼痛评分降低。由此，抗 NGF 抗体加吗啡比仅用吗啡或仅用抗 NGF 抗体能更有效地降低静止痛。这些结果还显示出在手术前仅用抗 NGF 抗体以 1mg/kg 进行治疗比仅用吗啡以 0.3mg/kg 进行治疗能更有效地降低静止痛。

[0202] 图 3 显示了用 0.3mg/kg 或 1.0mg/kg 抗 NGF 抗体和 0、0.3mg/kg 或 1mg/kg 体重吗啡按照上述方法步骤治疗后的静止痛评分。与仅用 0.3mg/kg 吗啡治疗相比，0.3mg/kg 吗啡联合 0.3mg/kg 抗 NGF 抗体或 1mg/kg 抗 NGF 抗体的治疗显著地提高了疼痛缓减。图 3 中所示结果还证实，仅用 0.3mg/kg 或 1mg/kg 抗 NGF 抗体进行治疗（即，无吗啡治疗）提供了与用 0.3mg/kg 剂量的吗啡治疗后等同的疼痛缓减。此外，用抗 NGF 抗体以 1.0mg/kg 进行治疗联合用吗啡以 0.3mg/kg 进行治疗产生了至少等价于仅用 1mg/kg 吗啡所获得的疼痛缓减。这些结果证实了用抗 NGF 抗体治疗降低了实现有效疼痛缓减所需的吗啡量。

[0203] 这些实验证实了抗 NGF 抗体加吗啡的治疗比仅用吗啡或仅用抗体治疗能更有效地降低静止痛。

[0204] 虽然通过示例性说明和实施例为便于清楚理解的目的对上述发明进行了一定详细程度的描述，但说明书和实施例并非意在限制本发明的范围。

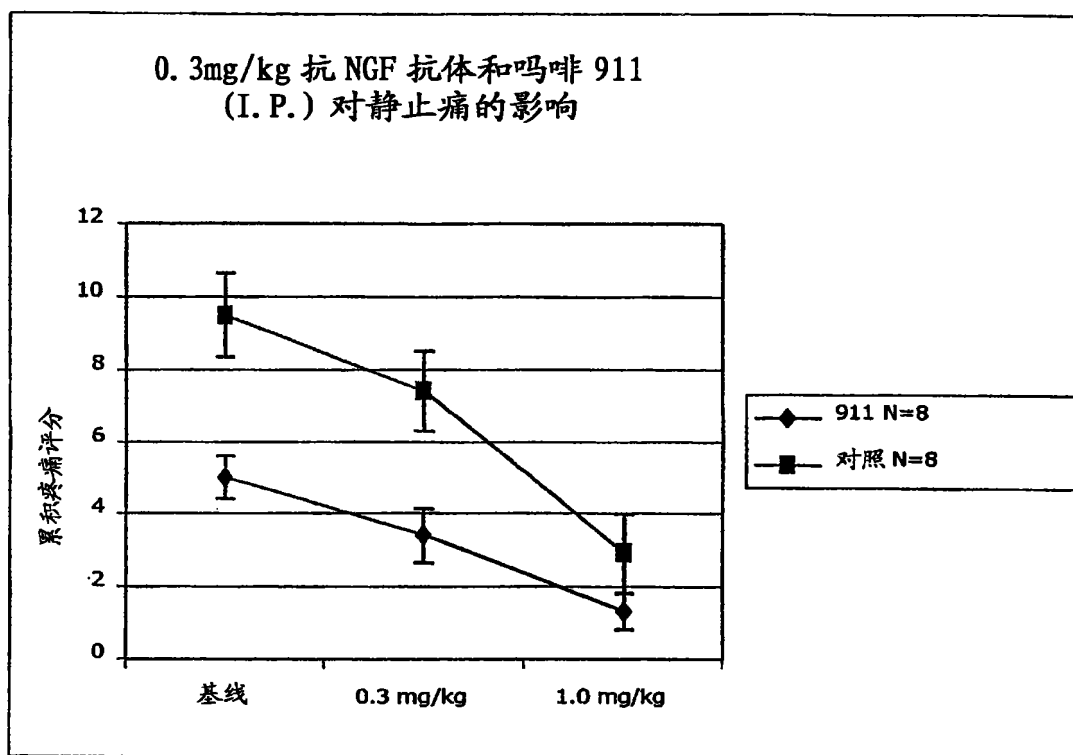


图 1

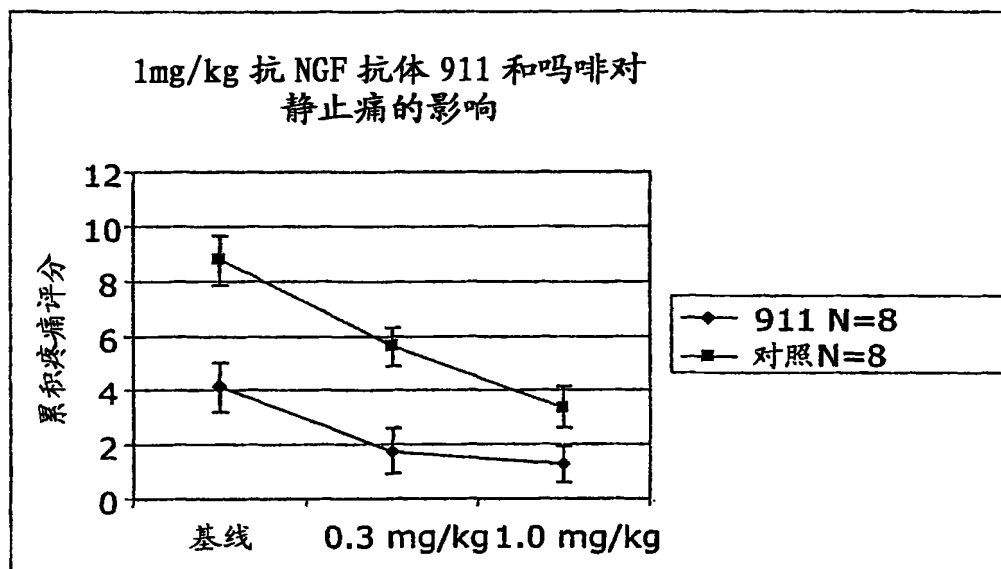


图 2

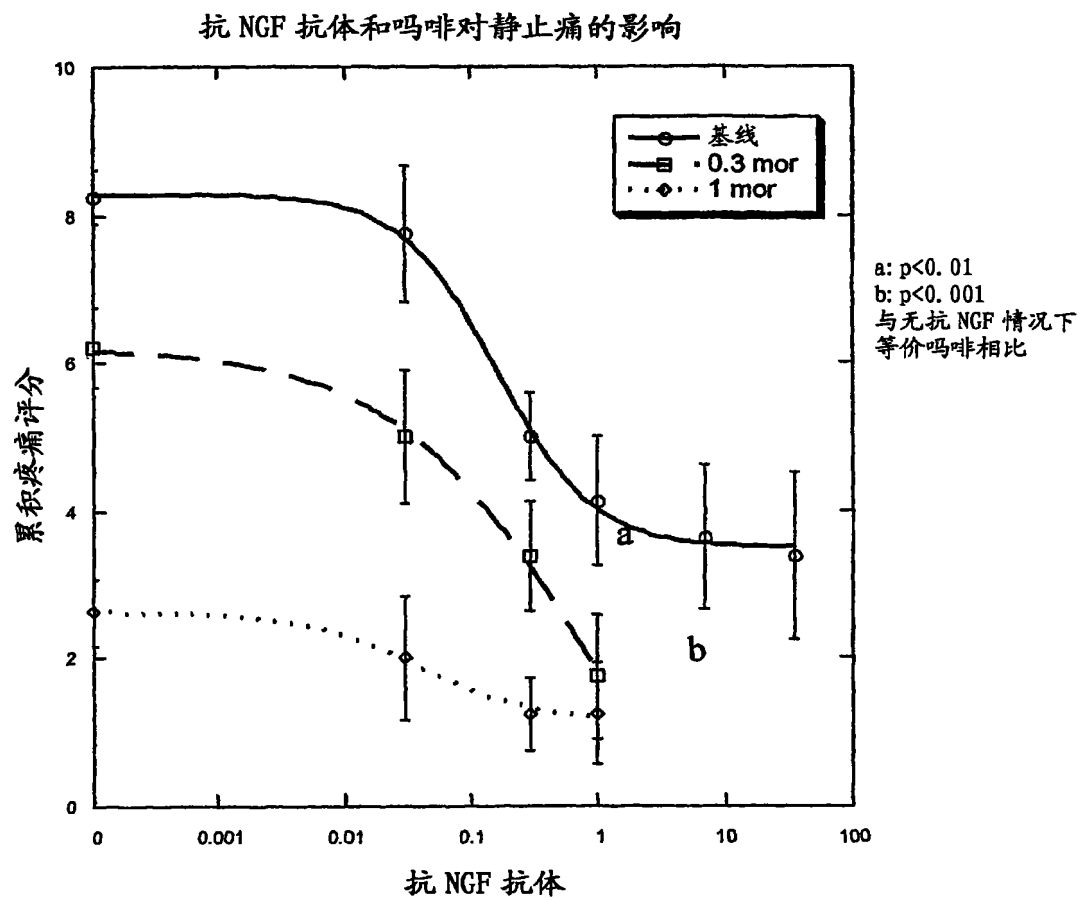


图 3