Journal of Veterinary Internal Medicine

ACVIM American College of Veterinary Internal Medicine

Otwarty dostęp

J Vet Intern Med 2016;30:1138–1148

Specyficzne kocie przeciwciało skierowane przeciw czynnikowi wzrostu nerwów poprawia mobilność u kotów z bólem związanym z chorobą zwyrodnieniową stawów: pilotażowe badanie typu „proof-of-concept"

M.E. Gruen, A.E. Thomson, E.H. Griffith, H. Paradise, D.P. Gearing, and B.D.X. Lascelles

Tło: Przeciwciała neutralizujące skierowane przeciw czynnikowi wzrostu nerwów (NGF) mają działanie przeciwbólowe w modelach przeprowadzonych na gryzoniach, w bólu związanym z naturalnie występującą chorobą zwyrodnieniową stawów (ang. *degenerative joint disease - DJD*) u psów i bólu przewlekłym u ludzi.
Cele: Ocena skuteczności w pełni felinizowanego przeciwciała anty-NGF (NV-02) w leczeniu bólu i upośledzenia mobilności związanych z DJD u kotów.
Zwierzęta: Trzydzieści cztery należące do klientów koty z bólem i upośledzeniem mobilności związanymi z DJD.
Metody: W pilotażowym, maskowanym badaniu klinicznym z kontrolą placebo koty zostały losowo przydzielone do jednej z grup, w których podano pojedynczą dawkę NV-02 (0,4 mg/kg, podskórnie [n = 11] lub 0,8 mg/kg, podskórnie [n = 12]) lub placebo (sól fizjologiczna, podskórnie [n = 11]). Aktywność kotów mierzono w sposób obiektywny. Dodatkowo właściciele wypełniali kwestionariusze będące instrumentami metrologii klinicznej (CSOM – specyficzna dla klienta ocena wyników leczenia i FMPI – wskaźnik bólu mięśniowo-szkieletowego kotów) w dniach: 0 (badanie przesiewowe), 14 (stan początkowy, podanie leku/placebo), 35, 56 i 77. Do oceny obiektywnych danych dotyczących aktywności użyto modelu pomiarów powtarzanych.
Wyniki: NV-02 spowodował istotny wzrost mierzonej w sposób obiektywny aktywności ogólnej ($P = 0{,}017$) oraz aktywności po 2 ($P = 0{,}035$), 3 ($P = 0{,}007$), 4 ($P = 0{,}006$), 5 ($P = 0{,}007$) i 6 ($P = 0{,}017$) tygodniach od podania. Wyniki dla CSOM ($P = 0{,}035$) i wskaźnika bólu ($P = 0{,}024$) wskazywały na istotny efekt badanego leku po 3 tygodniach od podania. W grupie kotów, którym podano lek, 83% właścicieli prawidłowo rozpoznało zastosowane leczenie, w porównaniu z 45% właścicieli kotów z grupy placebo ($P = 0{,}013$). Nie stwierdzono żadnych zdarzeń niepożądanych związanych z zastosowanym leczeniem.
Wnioski: Te dane pilotażowe wskazują na utrzymywanie się przez 6 tygodni pozytywnego efektu przeciwbólowego tego w pełni felinizowanego przeciwciała anty-NGF u kotów cierpiących na ból związany z DJD.
Słowa kluczowe: specyficzna dla klienta ocena wyników leczenia; wskaźnik bólu mięśniowo-szkieletowego kotów; choroba zwyrodnieniowa stawów.

Wiele kotów dorosłych i geriatrycznych ma radiograficzne dowody choroby zwyrodnieniowej stawów (DJD)[1,2], a duża część przypadków tej choroby wiąże się z przewlekłym bólem, objawiającym się zmianami w mobilności i aktywności. W Stanach Zjednoczonych nie ma leków zatwierdzonych do długoterminowego leczenia bólu przewlekłego u kotów, mimo że istnieje oczywiste zapotrzebowanie na takie produkty lecznicze.

Obecnie w Europie do stosowania w leczeniu przewlekłego bólu u kotów zatwierdzony jest niesteroidowy lek przeciwzapalny (NLPZ) meloksykam, ale w Stanach Zjednoczonych nie został on jak dotąd zarejestrowany do stosowania w tym celu. Istnieją obawy dotyczące długoterminowego stosowania produktów NLPZ u kotów, zwłaszcza że większość kotów z dolegliwościami bólowymi związanymi z DJD ma także objawy przewlekłej choroby nerek[3]. Ze względu na te zastrzeżenia, prowadzono próby z niższymi niż zatwierdzone w Europie dawkami meloksykamu, a wyniki przeprowadzonych badań otwartych sugerują, że te niższe dawki są skuteczne w leczeniu bólu związanego z DJD u kotów[4,5]. Przeprowadzono tylko jedno ślepe badanie z kontrolą placebo, w którym oceniano dawkę mniejszą niż zatwierdzona dawka dobowa 0,05 mg/kg, a badanie to wykazało, że dawka 0,035 mg/kg na dobę przyniosła wymierną poprawę w ciągu trzech tygodni od rozpoczęcia leczenia[6,7]. Prawdę mówiąc, opublikowano tylko 2 maskowane badania kliniczne z kontrolą placebo dotyczące skuteczności meloksykamu u kotów[6-8].

Przeciwciała neutralizujące skierowane przeciw czynnikowi wzrostu nerwów (NGF) wykazują działanie przeciwbólowe w modelach gryzoni[9] oraz u ludzi[10] z bólem przewlekłym, jednak jak dotąd żadne z nich nie zostało jeszcze zatwierdzone do stosowania u ludzi. Wykorzystując opatentowaną technologię konwersji międzygatunkowej przeciwciał, opartą na analizie ekspresji sekwencji cDNA (PETization™), firma Nexvet Biopharma opracowała nowe, w pełni felinizowane, terapeutyczne przeciwciało monoklonalne (mAb) anty-NGF (o nazwie NV-02), przeznaczone do łagodzenia bólu u kotów[11].

Postawiliśmy hipotezę, że pojedyncza, podana podskórnie dawka przeciwciała anty-NGF będzie łagodzić ból i poprawi mobilność kotów w okresie nawet do 6 tygodni. Pozytywne zmiany będą możliwe do wykrycia

Skróty:

AC	wyniki zliczania aktywności
AM	monitory aktywności
CMI	instrument metrologii klinicznej
CSOM	specyficzna dla klienta ocena wyników leczenia
DJD	choroba zwyrodnieniowa stawów
FMPI	wskaźnik bólu mięśniowo-szkieletowego kotów
NCSU-CVM	College Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Stanowego Karoliny Północnej
NGF	czynnik wzrostu nerwów
OA	osteoarthritis, choroba zwyrodnieniowa stawów

Program Badań Porównawczych nad Bólem, College Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Stanowego Karoliny Północnej (NCSU), Raleigh, NC, USA (Gruen, Thomson, Paradise, Lascelles); Instytut Medycyny Porównawczej, College Medycyny Weterynaryjnej NCSU, Raleigh, NC, USA (Gruen, Lascelles); Departament Statystyki, NCSU, Raleigh, NC, USA (Griffith); Nexvet Australia Pty Ltd, Melbourne, VIC, Australia (Gearing); oraz Centrum Badań Bólu i Innowacji, UNC Dental School, Chapel Hill, NC, USA (Lascelles).

Prace prowadzono w College'u Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Stanowego Karoliny Północnej, w ramach Programu Badań Porównawczych nad Bólem.

Autor do korespondencji: B.D.X. Lascelles, Comparative Pain Research Program, NCSU College of Veterinary Medicine, 1060 William Moore Drive, Raleigh, NC 27607, USA; e-mails: Duncan_lascelles@ncsu.edu; dxlascel@ncsu.edu.

Otrzymano 1 lutego 2016 r.; Poprawiono 5 kwietnia 2016 r.; Zatwierdzono 28 kwietnia 2016 r.

Copyright © 2016 Autorzy. Journal of Veterinary Internal Medicine publikowany przez Wiley Periodicals, Inc. na zlecenie American College of Veterinary Internal Medicine.

Jest to artykuł z otwartym dostępem na warunkach licencji Creative Commons Uznanie autorstwa-Użycie niekomercyjne, która zezwala na jego użytkowanie, dystrybucję, kopiowanie i odtwarzanie na dowolnym nośniku, pod warunkiem, że oryginalne dzieło jest prawidłowo cytowane i nie jest wykorzystywane w celach komercyjnych.

DOI: 10.1111/jvim.13972

przez właścicieli i znajdą odzwierciedlenie w aktywności mierzonej w sposób obiektywny. Pierwszorzędowym celem tego badania pilotażowego była ocena ogólnego potencjału skuteczności podawanego podskórnie NV-02 w zakresie poprawy ocenianej przez właściciela mobilności i aktywności oraz wzrostu wyników mierzonej w sposób obiektywny aktywności u kotów z DJD, w porównaniu z placebo. Celami drugorzędowymi były: (1) ustalenie ogólnego czasu utrzymywania się poprawy w zakresie ocenianej przez właściciela mobilności i aktywności oraz czasu osiągania wyższych wyników w mierzonej w sposób obiektywny aktywności u kotów z bólem związanym z DJD po podskórnym podaniu im NV-02, w 11-tygodniowym okresie objętym badaniem (2 tygodnie przed podaniem leku i 9 tygodni po podaniu leku), w porównaniu z placebo; (2) określenie względnego potencjału skuteczności i optymalnego dawkowania NV-02 na podstawie badania 2 grup różniących się podaną dawką; oraz (3) ocena niepożądanych efektów związanych z NV-02 u kotów, innych niż te, które stwierdzono we wstępnych badaniach na kotach laboratoryjnych.

Materiały i metody

Badanie to zostało zatwierdzone przez Komitet ds. Opieki nad Zwierzętami i Wykorzystywania Zwierząt (Protokół nr 14-043-O) w College'u Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Stanowego Karoliny Północnej (NCSU-CVM), a w każdym przypadku po ustnym omówieniu badania uzyskano pisemną zgodę właściciela na wzięcie w nim udziału. Publikowanie danych z badania jest zgodne z wytycznymi CONSORT (http://www.consort-statement.org/consort-2010).

Projekt badania

To badanie zaprojektowano jako podwójnie ślepe, randomizowane badanie pilotażowe z kontrolą placebo, prowadzone na kotach podzielonych na 3 grupy, z których każda liczyła 12 osobników. Pomiary wyników leczenia, po podaniu albo leku zawierającego substancję czynną, albo placebo, obejmowały zmiany ocen dokonywanych przez właściciela i zmiany aktywności (mierzonej metodą akcelerometryczną). Dodatkowo oceniano zdarzenia niepożądane, w tym zmiany kliniczno-patomorfologiczne.

Zwierzęta

Wszystkie zwierzęta biorące udział w badaniu były należącymi do klientów kotami z bólem i upośledzeniem mobilności związanymi z naturalnie występującą DJD. Uczestników badania rekrutowano przez jednoczesną akcję reklamową skierowaną bezpośrednio do właścicieli kotów i do lekarzy weterynarii. Właściciele nie ponosili żadnych opłat za wszelkie procedury wykonywane w związku z prowadzonym badaniem. Zastosowaliśmy również opisane niedawno koncepcje dotyczące rekrutacji i zachęt skłaniających właścicieli do wzięcia udziału w badaniach klinicznych z udziałem kotów[12].

Wstępne badanie przesiewowe

W odpowiedzi na ogłoszenie reklamowe lub dowiedziawszy się o planowanym badaniu w inny sposób, właściciele zgłaszali się albo drogą e-mailową, albo telefonicznie. Wyjaśniono im koncepcję badania oraz stawiane wymagania, zwracając szczególną uwagę na następujące warunki: koty musiały stale przebywać w domu, musiały tolerować noszenie obroży z urządzeniem do monitorowania aktywności oraz musiało u nich występować upośledzenie co najmniej 3 rodzajów aktywności. Właścicieli pytano, czy planują w najbliższej przyszłości jakieś zmiany w życiu, takie jak przeprowadzka, przyjście na świat nowego dziecka, wprowadzenie do domu nowego zwierzęcia lub wyjazd na długie wakacje. Koty, które były odpowiednimi kandydatami do włączenia do badania, kierowano na wizytę w weterynaryjnym szpitalu klinicznym.

Kryteria włączające i wykluczające

Kryteria kwalifikacyjne były podobne do stosowanych we wcześniej przeprowadzonych w ramach naszego programu badaniach dotyczących bólu związanego z DJD u kotów[6]. Koty zostały dopuszczone do udziału w badaniu, jeżeli posiadały odpowiedni stopień zaobserwowanego przez właściciela upośledzenia mobilności lub aktywności (opisanego w następnej części artykułu), wykazywały objawy bólu przy manipulowaniu co najmniej 2 stawami lub odcinkami kręgosłupa podczas weterynaryjnej oceny ortopedycznej (omówionej w części Ocena ortopedyczna) oraz miały radiograficzne dowody DJD w co najmniej 2 z bolesnych stawów lub odcinków kręgosłupa (omówione w części Ocena radiograficzna). Koty musiały być w wieku co najmniej 1 roku i musiały ważyć więcej niż 1 kg. Ustalone wcześniej dla wszystkich kotów kryteria wykluczające obejmowały podejrzenie lub obecność rozpoznanej choroby zakaźnej, objawowej choroby serca, choroby o podłożu immunologicznym, choroby nowotworowej, nieswoistego zapalenia jelit, infekcji dróg moczowych, nadczynności tarczycy lub cukrzycy. Te schorzenia wykluczono u kotów na podstawie dokumentacji medycznej otrzymanej od lekarza prowadzącego, wywiadu z właścicielem, badania fizykalnego, morfologii krwi, badań biochemicznych surowicy, poziomu T4 i badania ogólnego moczu. Do wzięcia udziału w badaniu dopuszczono koty z przewlekłą chorobą nerek (CKD) do stadium 2 włącznie według klasyfikacji IRIS (International Renal Interest Society), pod warunkiem, że ich choroba była stabilna, co potwierdzać musiały wyniki powtarzanych badań parametrów biochemicznych surowicy, poziomu T4 oraz badań ogólnych moczu. Koty z CKD w stadium 3 lub 4 według IRIS zostały wykluczone z udziału w badaniu.

Dokonywana przez właściciela ocena upośledzenia mobilności

Podczas wywiadu przesiewowego właścicieli poproszono o podanie 3 aktywności, w których wykonywaniu ich kot wykazuje upośledzenie, jak to opisano wcześniej[6]. Te 3 aktywności zostały następnie wykorzystane jako pozycje w skonstruowanym instrumencie specyficznej dla klienta oceny wyników leczenia (CSOM), który był używany później w badaniu. Właściciele dokonywali oceny zdolności kota do wykonywania każdej z tych aktywności za pomocą skali Likerta o punktacji od 4 (bez problemów) do 0 (wykonanie niemożliwe) przez oceny pośrednie: 3 (niewielka trudność), 2 (umiarkowana trudność) i 1 (duża trudność). Oceny właściciela były przetwarzane na wyniki liczbowe, a całkowity wynik oceny CSOM był sumą 3 takich ocen, co oznacza, że możliwy zakres ocen wynosił 0–12. Aby zapewnić spełnienie warunku, że koty włączone do tego badania miały wystarczający stopień upośledzenia (ocenianego przez właściciela) na skutek bólu związanego z DJD, do udziału w badaniu dopuszczono koty, które w dniu 0 uzyskały od właściciela ocenę ≤ 5 (niższe wartości wskazywały na wyższy stopień upośledzenia). Właściciele wypełniali formularze CSOM, nie wiedząc, jaka jest graniczna wartość ocen umożliwiających włączenie do badania).

Ocena ortopedyczna

Oceny ortopedycznej dokonywano w sposób opisany wcześniej[6,13,14], a badania przeprowadzała ta sama osoba będąca lekarzem weterynarii (MG), której towarzyszyła ta sama asystentka (AT). Przed wykonaniem badania radiograficznego stawów i jego oceną stawy były oceniane pod kątem bólu. Jak opisano wcześniej[6], ogólną ocenę bólu obliczano jako sumę ocen punktowych bólu dla wszystkich stawów kończyn oraz odcinków szkieletu osiowego.

Ocena radiograficzna

U kotów, które spełniły kryteria dopuszczające do udziału w badaniu ze względu na zauważone przez właściciela upośledzenie mobilności lub aktywności oraz dolegliwości bólowe stwierdzone podczas oceny ortopedycznej, zastosowano sedację i wykonano radiogramy w projekcji prostopadłej

każdego stawu i odcinka kręgosłupa. Radiogramy zostały ocenione pod kątem obecności DJD przez lekarza weterynarii specjalizującego się w radiologii, który nie dysponował wiedzą o istnieniu i umiejscowieniu bólu.

Metoda randomizacji

Każdy kot włączony do badania był losowo przydzielany przez personel apteki NCSU-CVM do jednej z grup, które miały otrzymać badany lek (w niskiej lub wysokiej dawce – patrz niżej), lub do grupy placebo. Randomizacji sposobu leczenia dokonywały grupy trzyosobowe, a klucz do randomizacji był znany wyłącznie personelowi farmaceutycznemu. Lek lub placebo wydawała apteka, a podany preparat był maskowany dla wszystkich osób, które uczestniczyły w zbieraniu danych. Dla zapewnienia równowagi, przed randomizacją koty zostały podzielone na warstwy o wyższym lub niższym stopniu upośledzenia, w oparciu o punktację CSOM (wynik CSOM 0, 1, 2 = wysoki stopień upośledzenia; wynik CSOM 3, 4, 5 = niski stopień upośledzenia), jednak nie analizowano tych warstw oddzielnie. Kod randomizacji oraz informacja, które koty zostały przydzielone do każdej grupy otrzymującej NV-02 lub do grupy placebo, zostały podane do wiadomości badaczy dopiero po wprowadzeniu wszystkich danych i przeprowadzeniu kontroli jakości danych przez personel, który nie brał bezpośredniego udziału w badaniu (personel należący do zespołu Clinical Studies Core).

Maskowanie

Napełnioną wcześniej strzykawkę umieszczano w brązowej, odpornej na światło torebce z tworzywa sztucznego, na której naklejano etykietę z numerem przypadku, imieniem kota oraz instrukcją: „Podać NV-02 LUB placebo jeden raz, przez wstrzyknięcie SC". Na etykiecie umieszczano także nazwisko lekarza weterynarii, który przepisał preparat, oraz dawkę (w ml). Strzykawkę z preparatem pozostawiano na 1 godzinę, aby jej zawartość osiągnęła temperaturę pokojową, a zastrzyk wykonywał technik weterynarii niezwiązany z badaniem (członek zespołu Clinical Studies Core). Każdy kot był przytrzymywany przez AT, która była zobowiązana do odwrócenia głowy w trakcie podawania kotu leku lub placebo. Objętość placebo była taka sama, jak objętość leku, więc nawet obserwacja objętości preparatu w strzykawce nie ujawniała jej zawartości.

Linia czasowa badania

Tabela 1 ukazuje zarys protokołu badania oraz działań podejmowanych w poszczególnych punktach czasowych. Właściciel odwiedził klinikę wraz z kotem 3 razy w ciągu trwającego 11 tygodni badania (w dniu 0, dniu 14 i dniu 77), oraz 2 razy bez kota (w dniu 35 i dniu 56). Oczekiwano, że czas utrzymywania się skuteczności NV-02, jeśli w ogóle efekt będzie zauważalny, będzie wynosił 4-6 tygodni. Badanie prowadzono przez czas dłuższy niż wymieniony wyżej, aby umożliwić określenie pełnego profilu skuteczności.

Badany związek

Związkiem, którym zajmowano się w opisywanym badaniu, było w pełni felinizowane przeciwciało skierowane przeciw NGF, któremu nadano nazwę NV-02[11], będące obecnie przedmiotem prac badawczych zmierzających do zatwierdzenia go jako leku do zwalczania bólu związanego z DJD u kotów. Związek NV-02 został dostarczony przez Nexvet jako sterylny roztwór zawierający 1,9 mg/ml przeciwciała anty-NGF w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (pH 7,2). Grupy terapeutyczne były następujące: T1: pojedyncza dawka 0,4 mg/kg NV-02, podskórnie; T2: pojedyncza dawka 0,8 mg/kg NV-02, podskórnie; oraz P: pojedyncza dawka sterylnej soli fizjologicznej o objętości 0,21 ml/kg lub 0,42 ml/kg (przydzielana losowo).

Określenie wskaźników wyników leczenia

Aby w pełni scharakteryzować potencjalną odpowiedź obserwowaną po podaniu NV-02, wybrano kilka wskaźników skuteczności.

Pierwszorzędowe wskaźniki skuteczności

1. Aktywność mierzona za pomocą akcelerometru (wyniki pomiarów aktywności; ocena obiektywna)
2. Ocena dokonana przez właściciela przy użyciu instrumentów metrologii klinicznej (ocena subiektywna):
   a. Wskaźnik bólu mięśniowo-szkieletowego kotów (ang. *feline musculoskeletal pain index – FMPI*)
   b. Specyficzna dla klienta ocena wyników leczenia (ang. *client-specific outcome measure – CSOM*)

Drugorzędowy wskaźnik skuteczności

1. Ocena właściciela, czy kot otrzymał lek zawierający substancję czynną (ocena subiektywna)

Akcelerometria (aktywność)

Akcelerometry wykorzystane do pomiaru aktywności (zwane dalej „monitorami aktywności" – AM), a także ich zastosowanie u kotów, zostały opisane wcześniej[6,8,15]. Urządzenia AM zainstalowano u wszystkich kotów na zakładanej na szyję obroży. AM zostały zaprogramowane tak, aby w sposób ciągły zbierały dane pochodzące z trwających 1 minutę epizodów.

Tabela 1. Zarys protokołu badania oraz działań w każdym punkcie czasowym.

Dzień badania	Działanie
Przed wizytą w szpitalu weterynaryjnym	- Telefoniczne badanie przesiewowe pacjentów/właścicieli - Zapoznanie się z dokumentacją medyczną pacjenta
Skrining – Dzień 0 Wizyta właściciela z kotem	Badanie przesiewowe kota i właściciela: - Podpisanie świadomej zgody przez właściciela - Wypełnienie kwestionariuszy CSOM i FMPI - Wypełnienie skali dyspozycyjnego optymizmu - Badanie fizykalne, neurologiczne i ortopedyczne - Morfologia pełna; biochemia; T4, badanie ogólne moczu, ± białko/kreatynina w moczu - Badanie radiograficzne w sedacji (w razie potrzeby) - Przydzielenie numeru przypadku i dokonanie losowego przydziału kota do grupy terapeutycznej - Wyposażenie kota w akcelerometr (do zbierania danych dotyczących aktywności)
Dni 1–14 (tygodnie 1 i 2)	- Zbieranie danych początkowych przez akcelerometr (aktywność)
Dzień 14 (± 2 dni) Wizyta właściciela z kotem	- Pobranie danych z akcelerometru (aktywność) - Wypełnienie kwestionariuszy CSOM i FMPI (początkowych) - Podanie leku z substancją czynną (NV-02) lub placebo, podskórnie
Dni 15–35 (tygodnie 3, 4 i 5)	- Zbieranie danych przez akcelerometr (aktywność)
Dzień 35 (± 2 dni) Wizyta właściciela	- Wypełnienie kwestionariuszy CSOM i FMPI
Dni 36–56 (tygodnie 6, 7 i 8)	- Zbieranie danych przez akcelerometr (aktywność)
Dzień 56 (± 2 dni) Wizyta właściciela	- Wypełnienie kwestionariuszy CSOM i FMPI
Dni 57–77 (tygodnie 9, 10 i 11)	- Zbieranie danych przez akcelerometr (aktywność)
Dzień 77 (± 2 dni) Wizyta właściciela z kotem	- Wypełnienie kwestionariuszy CSOM i FMPI - Badanie fizykalne i neurologiczne - Morfologia pełna; biochemia; badanie ogólne moczu - Pobranie danych z akcelerometru (aktywność)
Wycofanie z badania	Postępowanie zgodnie z planem na dzień 77 (tzn. jeżeli pacjenta wyłączono z badania, przeprowdzano ocenę przewidzianą na dzień 77)

CSOM (ang. *Client-Specific Outcome Measures*) – specyficzna dla klienta ocena wyników leczenia; FMPI (ang. *Feline Musculoskeletal Pain Index*) – wskaźnik bólu mięśniowo-szkieletowego kotów.

Oceny dokonywane przez właściciela

Wskaźnik bólu mięśniowo-szkieletowego kotów (FMPI). Wersja instrumentu, z której korzystano w tym badaniu (nr 10), została opublikowana niedawno[6]. Kwestionariusz FMPI zawierał pytania do właściciela o zdolność kota do wykonywania każdej z 17 aktywności (ocenianych w skali Likerta od „normalnie" do „wcale") z możliwością wyboru „nie wiem lub nie dotyczy". W dwóch dodatkowych pozycjach kwestionariusza (pytania dotyczące bólu) każdy właściciel miał ocenić poziom bólu kota za pomocą standaryzowanej wizualnej skali analogowej o długości 100 mm. Oceny właścicieli zostały przeliczone na punkty w zakresie od 0 do 4 dla każdej pozycji, przy czym 0 = wcale i 4 = normalnie. Oceny na wizualnej skali analogowej ustalano, mierząc w każdym przypadku odległość (w mm) od początku skali (punktu zerowego) do znaku postawionego przez właściciela, przy czym 100 oznaczało „brak bólu". Zakres możliwych do uzyskania punktów wynosił w sumie 0-68 dla pozycji 1-17 i 0-100 dla każdego z 2 ostatnich pytań.

Kwestionariusz specyficznej dla klienta oceny wyników leczenia (CSOM). Konstrukcję kwestionariusza CSOM opisano wyżej. Kolejność pozycji CSOM była identyczna dla każdego kota i podczas każdej wizyty. Oceny dokonane przez właścicieli przetwarzano na oceny numeryczne, a całkowity wynik CSOM był sumą 3 takich ocen i mógł mieścić się w zakresie 0–12, przy czym im wyższa punktacja, tym niższy stopień upośledzenia.

Ocena właściciela, czy kot otrzymał lek zawierający substancję czynną. Na końcu okresu objętego badaniem (w dniu 77) każdemu właścicielowi zadano pytanie: „Czy uważa Pan/Pani, że Pana/Pani kot otrzymał przeciwciało skierowane przeciw czynnikowi wzrostu nerwów?" Właścicieli proszono o udzielenie odpowiedzi „tak" lub „nie", a ich odpowiedzi zapisywano.

W tym badaniu pilotażowym dokonano trzyetapowej oceny bezpieczeństwa:

1. Ocena kliniczna kotów po podaniu NV-02 lub placebo, w celu wykrycia reakcji alergicznej
2. Ocena zmian wyników morfologii krwi, biochemii surowicy i badania ogólnego moczu
3. Ocena zdarzeń niepożądanych zgłoszonych przez właścicieli

Po podaniu NV-02 lub placebo prowadzono trwającą 4 godziny ciągłą obserwację kotów w celu uchwycenia objawów wskazujących na reakcję alergiczną, w tym drapania lub ocierania się, zwiększonej częstości oddechów, tachykardii, pokrzywki i osłabienia. W głównym pomieszczeniu, jakim dysponował zespół Programu Badań Porównawczych nad Bólem, znajdowały się klatki, w których umieszczano koty, a 2 techników prowadziło ich ciągłą obserwację. Częstość oddechów sprawdzano co 15 minut.

Próbki do badań krwi i moczu pobierano od wszystkich kotów w dniu 0 (stan początkowy) i w dniu 77, aby określić ewentualne zmiany parametrów morfologii krwi i biochemii surowicy, do jakich doszło w okresie objętym badaniem.

Właścicieli proszono o zgłaszanie wszelkich nietypowych dla ich kota zdarzeń natychmiast po ich wystąpieniu, korzystając z podanych sposobów kontaktu. Każdego właściciela poinstruowano, aby w przypadku wystąpienia zdarzenia niepożądanego (ang. *adverse event – AE*), niezwłocznie przywiózł swojego kota na oddział ratunkowy NCSU-CVM lub do miejscowego pogotowia weterynaryjnego. Zdarzenie niepożądane zdefiniowano jako każde zaobserwowane u kota zdarzenie, które było niekorzystne i niezamierzone i które wystąpiło w okresie objętym badaniem, niezależnie od tego, czy zostało uznane za mające związek z leczeniem, czy jego przyczyna była inna. Ciężkie zdarzenie niepożądane (ang. *serious adverse event – SAE*) w tym badaniu zdefiniowano jako każde zdarzenie niepożądane, które spowodowało śmierć lub zagrożenie życia, wymagało profesjonalnej interwencji (lekarza weterynarii) i zostało uznane przez badaczy za klinicznie ciężkie.

Analiza statystyczna

Estymacja liczebności próby. Opisywane badanie zostało zaprojektowane jako badanie pilotażowe i nie przeprowadzono formalnej analizy mocy, ponieważ przeciwciała anty-NGF nie były wcześniej stosowane u kotów i z tego względu nie można było oszacować spodziewanej różnicy między uczestniczącymi w badaniu grupami kotów. Jednym z celów tego badania było zebranie odpowiednio dużej liczby danych, która umożliwiłaby przeprowadzenie analizy mocy w większym badaniu skuteczności.

Analiza danych. W analizie skuteczności ujęto wszystkie koty, które brały udział w całym badaniu (do dnia 77), chyba że wykryto u nich inną chorobę lub problem, których pojawienia się nie można było na końcu badania przypisać działaniu użytych w badaniu związków, natomiast w analizie bezpieczeństwa ujęto wszystkie koty uczestniczące w badaniu, a do jej przeprowadzenia posłużyły wyniki badań laboratoryjnych wykonanych w dniu 0 i dniu 77 oraz zgłoszone przez właścicieli zdarzenia niepożądane. Przeprowadzono analizę danych dotyczących aktywności, porównując każdą grupę eksperymentalną (T1 i T2) z grupą, której podawano placebo. Po analizie obiektywnych danych dotyczących aktywności, grupy eksperymentalne zostały połączone w celu analizy danych subiektywnych. Za istotną uznano wartość *P* wynoszącą 0,05. Ze względu na pilotażowy charakter tego badania nie dokonano korekty wartości p dla wielokrotnych porównań.

Grupy (otrzymujące lek lub placebo) zostały porównane w celu uzyskania rozkładu wieku i masy ciała za pomocą testów *T*, rozkładu płci kotów za pomocą testu chi-kwadrat oraz rozkładu ocen kondycji ciała za pomocą testu sumy rang Wilcoxona.

Dane dotyczące aktywności (wyniki zliczania) były generowane w przedziałach o długości 1 minuty – przez całą dobę i cały okres objęty badaniem. Te wyniki zliczania były uśredniane w okresach tygodniowych, przez co dla każdego kota uzyskiwano jeden wynik dla całego tygodnia (średnią aktywność na minutę). Aktywność początkową kota zdefiniowano jako jego średnią aktywność na minutę w okresie pierwszych 2 tygodni badania (przed podaniem kotu leku lub placebo). Wartości średniej aktywności na minutę posłużyły do obliczenia zmian aktywności każdego kota dla każdego tygodnia badania po podaniu leku lub placebo (tygodnie 3-11) w porównaniu ze stanem początkowym. Dane te były analizowane przy użyciu metody analizy wariancji dla pomiarów powtarzanych ANOVA, w tym analizowano interakcję tydzień × tydzień, ponieważ zbieranie danych dotyczących aktywności trwało dłużej niż oczekiwany czas utrzymywania się skuteczności NV-02. W celu przyjrzenia się różnicom między grupami w poszczególnych tygodniach zastosowano analizę kontrastów.

Dla ocen FMPI obliczano w poniższy sposób, jaki ułamek możliwej oceny stanowi ocena uzyskana:

$$\%\ \text{możliwej oceny FMPI dla pytań } 1-17 = \frac{\text{suma ocen dla pytań } 1-17}{\text{liczba pytań, na które udzielono odpowiedzi x } 4}$$

Dla każdego kota i każdego punktu czasowego, w którym dokonywano oceny (dzień 35, dzień 56 i dzień 77), obliczono zmiany wartości %FMPIposs oraz wyników CSOM względem stanu początkowego (dzień 14) i wykorzystano je do porównań wewnątrzgrupowych (test znakowanych rang Wilcoxona) oraz porównania zmian między grupami (test sumy rang Wilcoxona). Odpowiedzi na pytania 18 i 19 w kwestionariuszu FMPI analizowano oddzielnie, ponieważ były to pytania, do których stosowano wizualną skalę analogową.

Przeprowadzono również analizę sukces–niepowodzenie dla danych CSOM, przyjmując za kryterium sukcesu wzrost wyniku CSOM o ≥2, bez spadku wyniku dla którejkolwiek aktywności[6,7]. W analizie sukces–niepo-

wodzenie zastosowano test chi-kwadrat Pearsona. Wielkość efektu (*d* Cohena dla leczenia względem placebo) obliczono na podstawie zmiany wyniku w porównaniu ze stanem początkowym dla grup, którym podano lek lub placebo, oraz odchylenia standardowego dla zmiany wyniku, zgodnie z następującym równaniem:

$$d \text{ Cohena dla leczenia względem placebo} = \frac{(\text{Średnia zmiana wyniku w grupie leczonej}) - (\text{Średnia zmiana wyniku w grupie placebo})}{(\text{łączne odchylenie standardowe})}$$

Podczas oceny rozpoznawania przez właścicieli, czy ich kotu podano przeciwciało anty-NGF, za sukces uznawano prawidłowe wybranie przez właściciela podanego preparatu (leku/placebo), a dane analizowano za pomocą testu chi-kwadrat Pearsona.

Opisano wszelkie reakcje alergiczne i AE. Do porównania wyników badań laboratoryjnych z dnia 0 z wynikami badań laboratoryjnych na końcu okresu objętego badaniem (dzień 77) dla połączonej grupy eksperymentalnej i dla grupy placebo, a także do porównania połączonej grupy eksperymentalnej i grupy placebo w dniu 0 i dniu 77 zastosowano test *T* dla par wiązanych. Do porównania wyników badań laboratoryjnych z dnia 0 i ostatniego dnia badania dla zmiennych laboratoryjnych niewykazujących rozkładu normalnego (do badania zgodności z rozkładem normalnym służył test Kołmogorowa-Smirnowa) wykorzystano test znakowanych rang Wilcoxona.

Wyniki

Rekrutację i wstępne badanie przesiewowe przeprowadzono między 31 marca 2014 r. a 23 kwietnia 2015 r. (około 56 tygodni). Pomyślna rekrutacja do badania postępowała z szybkością 0,61 kotów/tydzień, a analogiczny wskaźnik dla badania przesiewowego wynosił 0,86 kotów/tydzień. Otrzymano zgłoszenia od 114 potencjalnych kandydatów i skontaktowano się z nimi pocztą elektroniczną lub telefonicznie. Po pierwszym kontakcie telefonicznym z właścicielami 66 kotów uznano za niekwalifikujące się do badania przesiewowego z przyczyn przedstawionych w tabeli 2.

W badaniu przesiewowym wzięło udział w sumie 48 kotów, a 14 z nich uznano za nienadające się do wzięcia udziału w opisywanym badaniu z powodów wymienionych w tabeli 3.

Nie stwierdzono żadnych różnic między grupami, którym podano lek NV-02 lub placebo, ze względu na wiek ($P = 0{,}63$), płeć ($P = 0{,}255$), masę ciała ($p = 0{,}356$) oraz ocenę kondycji ciała ($P = 0{,}228$). Wyniki te przedstawiono w tabeli 4. Jedenaście kotów otrzymało placebo, a 23 kotom podano NV-02. Z 23 kotów, którym podano NV-02, 11 kotów otrzymało dawkę 0,4 mg/kg, a 12 kotów dawkę 0,8 mg/kg.

Do dnia 77 z badania nie wyłączono żadnego kota. Wszystkie koty biorące udział w badaniu zostały ujęte w analizie bezpieczeństwa. Przepływ uczestników w okresie objętym badaniem ukazano na rysunku 1. W dniu 77 stwierdzono, że jeden kot (z grupy, której podawano dawkę NV-02 wynoszącą 0,4 mg/kg) ma ciężką dysfunkcję nerek (patrz informacje o zdarzeniach niepożądanych) i z tego powodu w analizie skuteczności nie uwzględniono danych dotyczących tego kota.

Tabela 2. Przyczyny uznania kotów za niekwalifikujące się do badania przesiewowego po pierwszym kontakcie z właścicielem

Liczba kotów	Przyczyna niedopuszczenia do badania przesiewowego
7	Wykluczające problemy zdrowotne
27	Brak odpowiedzi właściciela na próbę kontaktu
5	Niedostateczny stopień upośledzenia
4	Temperament nieodpowiedni do włączenia do badania
1	Kot wychodzący na zewnątrz
11	Ograniczenia właściciela ze względu na rozkład dnia/czas
2	Zdrowie właściciela
3	Kot nieakceptujący obroży
4	Właściciel niezainteresowany udziałem w badaniu
2	Kot otrzymujący leki niedozwolone w badaniu

Tabela 2. Przyczyny wykluczenia kotów po badaniu przesiewowym w dniu 0

Liczba kotów	Przyczyna wykluczenia po badaniu przesiewowym
4	Niewystarczające radiograficzne dowody DJD
3	Guz/nowotwór wykryty na radiogramie
2	Choroba serca
1	Wyniki badań laboratoryjnych wskazujące na chorobę układową
4	Inne problemy zdrowotne

Akcelerometria (aktywność)

Nie stwierdzono żadnej różnicy statystycznej w aktywności kotów między tygodniem 1 a tygodniem 2 (test znakowanych rang Wilcoxona, $P = 0{,}768$), dlatego za okres początkowy przyjęto łącznie tygodnie 1 i 2 (okres Tydz. 1/2), co pozwoliło na uzyskanie maksymalnej liczby danych początkowych.

Nie stwierdzono istotnych różnic między zmianami aktywności kotów w grupach T1 i T2, dlatego grupy T1 i T2 połączono w celu zbadania różnic w każdym tygodniu badania między grupą, której podano badany lek, a grupą, która otrzymała placebo. Przyjmując za stan początkowy średnią aktywność kota w okresie Tydz. 1/2 oraz badając zmianę aktywności wyrażoną jako procent aktywności w okresie Tydz. 1/2, stwierdzono istotny efekt tydzień × tydzień ($P = 0{,}0096$), istotny efekt sposobu leczenia ($P = 0{,}0258$) oraz istotny efekt sposób leczenia × tydzień × tydzień ($P = 0{,}017$). Istotne efekty sposobu leczenia (większa poprawa aktywności w grupie, której podano badany lek w porównaniu z grupą placebo) stwierdzono w tygodniu 4 ($P = 0{,}035$), tygodniu 5 ($P = 0{,}007$), tygodniu 6 ($P = 0{,}006$), tygodniu 7 ($P = 0{,}007$) i tygodniu 8 ($P = 0{,}018$). Procentową zmianę aktywności w czasie ukazano dla każdej grupy na rysunku 2, a średnie zmiany procentowe aktywności dla każdej grupy i dla każdego tygodnia zestawiono w tabeli 5.

Oceny właścicieli

Po analizie danych dotyczących aktywności grupy kotów, którym podano badany lek, połączono w celu analizy danych subiektywnych. Stwierdzono istotną poprawę (wzrost) wyników CSOM zarówno w połączonej grupie kotów, które otrzymały lek, jak i w grupie placebo – we wszystkich punktach czasowych, w których dokonywano oceny (w porównaniu z punktem początkowym, czyli dniem 14), z wyjątkiem dnia 77 dla grupy placebo ($P = 0{,}051$; tabela 6). W dniu 35 (3 tygodnie po podaniu NV-02 lub placebo) wystąpiła istotna różnica między grupami, jeśli chodzi o zmianę wyniku CSOM, przy czym w grupie, która otrzymała badany lek poprawa była istotnie większa niż w grupie placebo ($P = 0{,}035$). Natomiast nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między grupami pod względem stopnia poprawy w dniu 56 i dniu 77.

W dniu 35 (3 tygodnie po podaniu leku/placebo) poprawa w grupie placebo oznaczała zmniejszenie poziomu niepełnosprawności/bólu o 22%, a w grupie, której podano badany lek, zmniejszenie poziomu niepełnosprawności/bólu wyniosło 55%. Wielkość efektu (z przedziałem ufności 95%) w dniu 35 dla badanego leku względem placebo wynosiła 0,74 (-0,02 do 1,5).

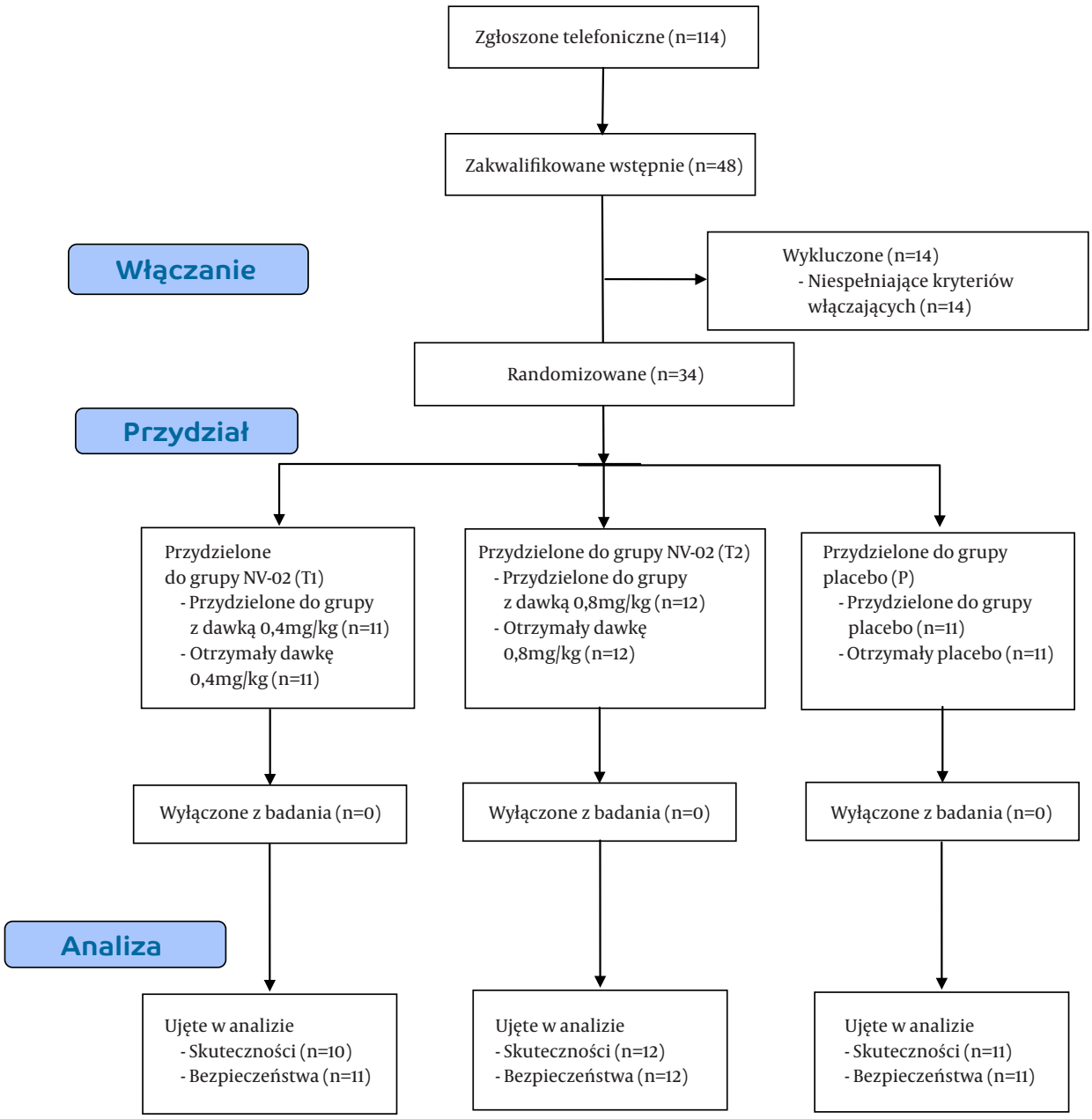
Stosując odcięcie wynoszące 2 jednostki poprawy w skali CSOM, nie stwierdzono istotnych różnic między grupami w analizie sukces-niepowodzenie, ale więcej sukcesów zaobserwowano w grupach kotów, którym podano badany lek, w porównaniu z grupą placebo (tabela 7). Przy tych samych kryteriach sukcesu/niepowodzenia, po pierwszych 3 tygodniach odpowiedź opiekunów kotów na placebo wynosiła 60%.

Stwierdzono istotną poprawę (wzrost) wyników %FMPIposs zarówno w połączonej grupie eksperymentalnej, jak i w grupie placebo, w każdym punkcie czasowym, w którym dokonywano oceny (w porównaniu ze stanem początkowym, czyli wynikami w dniu 14; tabela 8). W żadnym punkcie czasowym nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami z zakresie stopnia poprawy wskaźnika bólu.

Tabela 4. Podsumowanie danych demograficznych dotyczących kotów uczestniczących w badaniu.

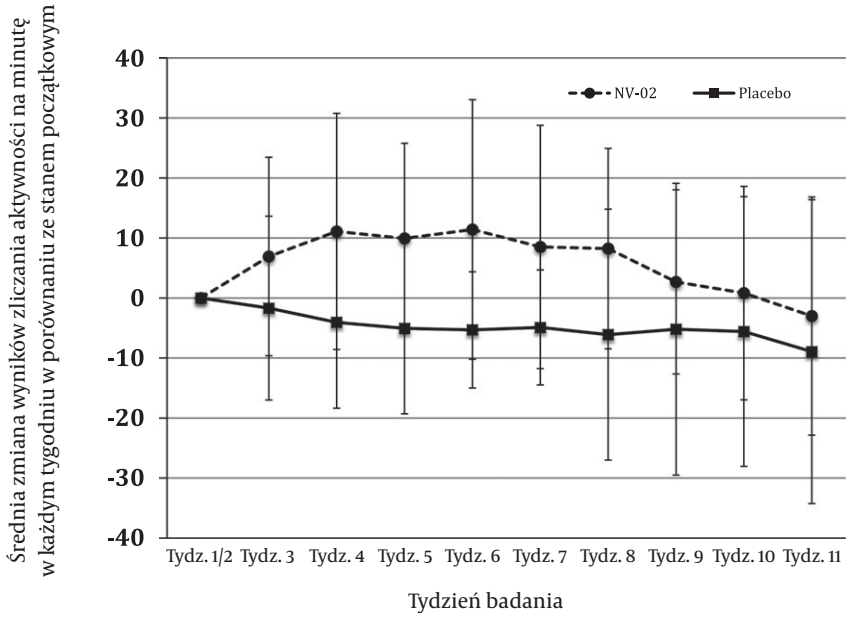
	NV-02 (n = 23)	Placebo (n = 11)	Wartość *P* dla porównania grup terapeutycznych
Wiek w latach; średnia (SD)	12,2 (3,1)	12,6 (1,94)	*P* = 0,63 (test *T*)
Płeć	12 FS; 11 MC	8 FS; 3 MC	*P* = 0,255 (test chi-kwadrat Pearsona)
Masa ciała w kg; mediana (SD)	6,10 (1,92)	5,55 (1,38)	*P* = 0,356 (test *T*)
BCS; mediana (zakres)	7 (4–9)	6 (4–9)	*P* = 0,228 (test sumy rang Wilcoxona)

BCS – ocena kondycji ciała; MC – samiec kastrowany; FS – samica sterylizowana; SD – odchylenie standardowe.



(W przeważającej części analizy skuteczności grupy T1 i T2 były połączone)

Rys. 1 Diagram ilustrujący przepływ przypadków w okresie objętym badaniem.



Rys. 2 Wykres procentowych zmian średnich tygodniowych wyników zliczania aktywności (będących faktycznie średnimi wynikami zliczania aktywności w przedziałach 1-minutowych w okresie tygodnia) względem stanu początkowego (czyli średniej aktywności dla tygodni 1 i 2, zanim podano kotom przeciwciało lub placebo) dla poszczególnych grup (lek/placebo) w każdym tygodniu badania.

Tabela 5. Średnia zmiana procentowa (± SD), obliczona względem stanu początkowego, średnich wyników zliczania aktywności w każdym tygodniu badania – dla każdej grupy i łącznie dla grup, którym podano lek. Aktywność początkowa została zdefiniowana jako średni wynik zliczania aktywności na minutę dla wszystkich kotów w okresie pierwszych 2 tygodni badania, które poprzedzały podanie kotom badanego leku lub placebo.

Tydzień badania	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tygodnie po aplikacji	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Placebo	– 1,7 (15,3)	– 4,0 (14,3)	– 5,0 (14,2)	– 5,3 (9,7)	– 4,9 (9,6)	– 6,1 (20,9)	– 5,2 (24,3)	– 5,6 (22,5)	– 8,9 (25,3)
T1 (NV-02 0,4 mg/kg)	11,5 (21,1)	15,4 (24,7)	14,9 (18,1)	15,3 (22,1)	5,1 (26,9)	7,8 (18,4)	– 0,6 (17,4)	4,5 (19,2)	2,8 (20,2)
T2 (NV-02 0,8 mg/kg)	3,1 (11,1)	7,5 (14,4)	5,8 (13,0)	8,2 (21,6)	11,4 (13,2)	8,6 (16,0)	5,4 (13,6)	– 2,2 (16,7)	3,1 (20,4)
T1 i T2 łącznie	6,9 (16,5)	11,1 (19,7)	9,9 (15,9)	11,4 (21,6)	8,5 (20,3)	8,2 (16,7)	2,7 (15,3)	0,8 (17,8)	– 3,0 (19,8)

SD – odchylenie standardowe; „Tygodnie po aplikacji" – liczba tygodni, które upłynęły od podania kotu NV-02 lub placebo.

Tabela 6. Zestawienie median (zakresów) i wyników porównań statystycznych dla zmian wyników CSOM (względem dnia 14) w dniu 35 (3 tygodnie po podaniu leku/placebo), dniu 56 (6 tygodni po podaniu leku/placebo) i dniu 77 (9 tygodni po podaniu leku/placebo). Wyższe wartości oznaczają większą poprawę.

		Zmiana wewnątrz grupy (test znakowanych rang Wilcoxona)		Zmiana wewnątrz grupy (test znakowanych rang Wilcoxona)		Zmiana wewnątrz grupy (test znakowanych rang Wilcoxona)
Czas oceny	Dzień 35		Dzień 56		Dzień 77	
T1 i T2 łącznie	5,5 (-2 do +10)	<0,0001	5 (0 do +11)	<0,0001	2,5 (-1 do +9)	<0,0001
Placebo	2 (-2 do +7)	0,023	4 (-7 do +9)	0,022	2 (-4 do +9)	0,051
Porównanie lek-placebo (test sumy rang Wilcoxona)	0,035		0,466		0,673	

Wyniki FMPI dla pytań 18 i 19 uległy istotnej poprawie zarówno w połączonej grupie kotów, którym podano badany lek, jak i w grupie kotów, które otrzymały placebo w każdym punkcie czasowym, w którym dokonywano oceny (w porównaniu ze stanem początkowym w dniu 14). W dniu 35 większa statystycznie istotna poprawa nastąpiła w grupie, której podano lek w porównaniu z grupą placebo, w przypadku pytania 18 („ból w ciągu ostatnich 3 tygodni"; $P = 0{,}024$), ale nie pytania 19 („ból w dniu dzisiejszym"; $P = 0{,}05$).

Właściciele kotów, którym podano przeciwbólowy lek anty-NGF, byli w stanie z większą trafnością rozpoznać, jaki preparat podano ich kotu, niż ci właściciele, których koty otrzymały placebo, przy czym 83% właścicieli było w stanie prawidłowo rozpoznać, że ich kot otrzymał NV-02, a tylko 45% było w stanie prawidłowo odgadnąć, że ich kotu podano placebo ($P = 0{,}013$). Ze względu na to, że rozpoznanie preparatu polegało na zgadywaniu, można było spodziewać się 50% prawidłowych wyników.

Bezpieczeństwo i zdarzenia niepożądane

U żadnego kota nie wystąpiły jakiekolwiek objawy reakcji alergicznej po wstrzyknięciu NV-02.

Zdarzenia niepożądane zgłoszono lub stwierdzono u 6 kotów. Jeden z kotów (NV-02, 0,8 mg/kg) zaczął drapać okolice obroży, dlatego zdjęto mu obrożę na 4 dni, a po upływie tego czasu założono mu inną. W okresie, kiedy kot nie nosił obroży, dwukrotnie zaaplikowano mu lek: maść zawierającą 3 antybiotyki i małą ilość hydrokortyzonu. U dwóch kotów (NV-02, 0,8 mg/kg i placebo) w dniu 77 stwierdzono podobny wzrost stężenia kreatyniny w surowicy krwi (wzrost odpowiednio od 1,7 mg/dl do 2,0 mg/dl i od 1,5 mg/dl do i 2,1 mg/dl). Powtórne badania laboratoryjne przeprowadzone 2-3 miesiące później wykazały u nich stabilne, ale podwyższone stężenie kreatyniny w surowicy. Właściciel 1 kota (NV-02, 0,4 mg/kg) zgłosił, że wcześniej występująca u kota łagodna astma prawdopodobnie uległa zaostrzeniu, gdyż częściej pojawiało się u niego „świstanie". Przepisano salbutamol do inhalacji i u kota nastąpiła widoczna poprawa, dlatego nadal uczestniczył w badaniu. Przed opisywanym badaniem nie postawiono definitywnego rozpoznania astmy u tego kota. U jednego kota (NV-02, 0,8 mg/kg) wystąpiły wymioty po wieczornym posiłku przez 3 kolejne dni po wstrzyknięciu NV-02. Na podstawie naszych wcześniejszych doświadczeń z kilku podobnych badań dotyczących produktów leczniczych do stosowania w przypadku bólu związanego z DJD u kotów, nie uznaliśmy żadnego z tych zdarzeń niepożądanych za mający związek z podaniem kotu NV-02.

Zgłoszono ciężkie zdarzenie niepożądane (SAE) u 1 kota, który otrzymał NV-02 w dawce 0,4 mg/kg, ale uznano, że zdarzenie to nie było związane z leczeniem. Przed włączeniem do badania kot miał rozpoznaną przewlekłą chorobę nerek w stadium 2 (według klasyfikacji IRIS). W połowie badania właściciel zgłosił, że istniejące wcześniej deformacja i pogrubienie kończyny sprawiają kotu ból, ale badania (badanie przedmiotowe, biopsja aspiracyjna cienkoigłowa pogrubiałej okolicy oraz radiografia) nie pozwoliły ustalić przyczyny takiego stanu, a poza tym stwierdzono, że stan ten nie ulega żadnej zmianie od początku badania. Kot miał tę deformację czy guz o nieznanej etiologii od kiedy był kocięciem, a stan tej anomalii nie zmieniał się z czasem. W czasie wizyty w dniu 77 właściciel poinformował, że jego kot od 10 dni coraz częściej się chowa i ma stale pogarszający się apetyt. Od początku badania kot stracił na wadze 0,72 kg, a wyniki jego badań laboratoryjnych, wykonanych w dniu 77, wskazywały na azotemię, hiperglobulinemię i leukocytozę z przesunięciem w lewo. Właściciel zrezygnował z leczenia kota i podjął decyzję o eutanazji. Pełne badanie pośmiertne oraz dokładne badanie nerek nie wykazały istnienia żadnego prawdopodobnego związku z podaniem kotu NV-02. Dane dotyczące tego kota włączono do analizy bezpieczeństwa, ale nie ujęto ich w analizie skuteczności. Badanie sekcyjne wykazało wieloogniskowe, łagodne, przewlekłe, limfoplazmatyczne śródmiąższowe zapalenie nerek z glomeluropatią oraz ogniskową, przewlekłą atrofię kory nerki i zwłóknienie nerki (zawał), przewlekłe limfohistiocytarne zapalenie pęcherzyka żółciowego i zapalenie dróg żółciowych, uznane za skutek wady wrodzonej drzewa żółciowego; mastocytomę okrężnicy; ogniskowy gruczolakorak płuc; ogniskowy, dobrze zróżnicowany włókniakomięsak kończyny tylnej (znany, istniejący wcześniej guz na kończynie tylnej, który w przeszłości nie ulegał zmianom); umiarkowane, wieloogniskowe, przewlekłe, limfohistiocytarne zapalenie trzustki z rozsianym włóknieniem i zanikiem pęcherzyków trzustkowych; oraz wieloogniskowe, limfoplazmatyczne zapalenie dwunastnicy. Badanie za pomocą mikroskopu elektronowego tkanek nerki nie wykazało żadnych dowodów na uwarunkowane immunologicznie kłębuszkowe zapalenie nerek. Nie stwierdzono istnienia jakiegokolwiek

Tabela 7. Podsumowanie analizy sukces-porażka dla wyników CSOM w grupach kotów, którym podano badany lek, i w grupie placebo.

	D35	D56	D77
T1 (NV-02 0,4 mg/kg)	90%	90%	60%
T2 (NV-02 0,8 mg/kg)	75%	92%	75%
T1 i T2 łącznie	82%	91%	68%
Placebo	56%	64%	64%
Porównanie lek (grupy łącznie) - placebo (test chi-kwadrat Pearsona)	0,097	0,056	0,794

Tabela 7. Zestawienie median (zakresów) i wyników porównań statystycznych dla zmian % możliwej oceny FMPI (względem dnia 14, w oparciu o odpowiedzi na pytania 1–17) w dniu 35 (3 tygodnie po podaniu leku/placebo), dniu 56 (6 tygodni po podaniu leku/placebo) i dniu 77 (9 tygodni po podaniu leku/placebo). Wyższe wartości oznaczają większą poprawę.

		Zmiana wewnątrz grupy (test znakowanych rang Wilcoxona)		Zmiana wewnątrz grupy (test znakowanych rang Wilcoxona)		Zmiana wewnątrz grupy (test znakowanych rang Wilcoxona)
Czas oceny	Dzień 35		Dzień 56		Dzień 77	
T1 i T2 łącznie	16 (1,3 to 36)	<0,0001	16 (2,6 to 34,5)	<0,0001	14,5 (1,2 to +35,3)	<0,0001
Placebo	7,4 (0 to 26,6)	0,002	10,6 (9,4 to +27,8)	0,010	14,4 (2,4 to 35,7)	0,001
Porównanie Tx-Placebo (test sumy rang Wilcoxona)	0,061		0,127		0,456	

związku między zastosowanym leczeniem a zdarzeniami niepożądanymi. W dniu 0 nie było żadnych różnic między grupami kotów uczestniczących w badaniu w zakresie poszczególnych zmiennych – wyników badań biochemicznych i hematologicznych krwi oraz badań ogólnych moczu.

W dniu 77 poziom białka całkowitego był istotnie wyższy w grupie kotów, którym podano badany lek (średnia ± SD = 7,6 ± 2,2 g/dl w porównaniu z 7,1 ± 1,7 g/dl dla grupy placebo; p = 0,024; zakres wartości referencyjnych 6,4-8,2 g/dl). Stężenie globulin w surowicy było istotnie wyższe w grupie kotów, którym podano badany lek (średnia ±SD = 4,2 ± 2,6 g/dl w porównaniu z 3,7 ± 1,98 g/dl dla grupy placebo; zakres wartości referencyjnych 2,9-4,8 g/dl).

Podczas oceny zmian wewnątrz grup nie stwierdzono istnienia w grupach kotów, którym podano badany lek lub placebo, żadnych istotnych zmian poszczególnych zmiennych w czasie. W sumie u 3 kotów stwierdzono wzrost stężenia kreatyniny w surowicy krwi od mieszczącego się w zakresie wartości referencyjnych do poziomu poza tym zakresem (szczegóły powyżej).

Dyskusja

Wyniki naszych badań wykazały wyraźny pozytywny efekt terapeutyczny NV-02, felinizowanego przeciwciała anty-NGF, u kotów z bólem i upośledzeniem mobilności związanymi z DJD. Korzystny efekt stwierdzono w zakresie aktywności mierzonej w sposób obiektywny, ale także, mimo dużego efektu placebo u opiekunów, w zakresie wyników subiektywnych pomiarów dokonywanych przez właścicieli kotów.

Aktywność mierzona w sposób obiektywny wzrosła w grupie kotów, którym podano NV-02, w okresie od tygodnia 2 do tygodnia 6 po podaniu leku. W niedawno przeprowadzonym przez nasz zespół badaniu dotyczącym meloksykamu (ślepym, z grupą kontrolną placebo, trwającym 2 tygodnie przed podaniem leku/placebo i 3 tygodnie po rozpoczęciu leczenia)[6] stwierdzono, że średni wzrost aktywności w porównaniu z okresem początkowym wynosił 5,97% w ciągu pierwszych 3 tygodni podawania meloksykamu codziennie (0,035 mg/kg m.c. na dobę) w porównaniu ze wzrostem o 2,65% w tym samym okresie u kotów, którym podawano placebo. Stwierdzony w niniejszym badaniu procentowy wzrost aktywności w stosunku do stanu początkowego w grupie kotów, którym podano badany lek (średnio o 9,3% w ciągu pierwszych 3 tygodni) przedstawia się bardzo korzystnie w porównaniu z badaniem dotyczącym meloksykamu podawanego codziennie w dawce 0,035 mg/kg.

Badanie dotyczące meloksykamu było pełnym badaniem krzyżowym, a jeżeli weźmie się pod uwagę oba okresy stosowania meloksykamu, to średni wzrost aktywności powyżej wartości początkowej (gdzie wartością początkową była aktywność w okresie bezpośrednio poprzedzającym każde leczenie) dla 3-tygodniowego okresu leczenia wynosił 9,45%, a różnica zmian aktywności między okresem leczenia a okresem podawania placebo wynosiła 10,62% na korzyść meloksykamu. Jak zauważono wyżej, w opisywanym obecnie badaniu poświęconym NV-02, średni wzrost aktywności względem stanu początkowego w grupie kotów, którym podano badany lek, wyniósł 9,3%, a różnica pomiędzy kotami, które otrzymały placebo, a kotami, którym podano NV-02, wynosiła po pierwszych 3 tygodniach 12,9%. Porównanie to pokazuje, że jednorazowe wstrzyknięcie NV-02 powoduje u kotów wzrost aktywności taki sam lub większy niż wzrost aktywności, jaki uzyskuje się dzięki codziennemu podawaniu meloksykamu w dawce 0,035 mg/kg. Nie przeprowadzono innych badań z kontrolą placebo dotyczących pomiarów aktywności u kotów będących własnością klientów, które można by porównać z opisywanym tutaj badaniem.

Chociaż efekt placebo w ocenach dokonanych przez opiekunów był znaczący (60% po pierwszych 3 tygodniach od podania preparatu, przy zastosowaniu kryteriów sukcesu/niepowodzenia), to wypełniane przez właścicieli kwestionariusze specyficznej dla klienta, subiektywnej oceny (CSOM) wyraźnie wskazywały na wykrycie zastosowanego u ich kota sposobu leczenia, przy czym stwierdzono istotną różnicę między grupami w całkowitej liczbie punktów uzyskanych po 3 tygodniach od podania leku/placebo, a także istotną różnicę w zakresie zmiany wyników CSOM w ciągu pierwszych 3 tygodni od podania. Wielkość efektu (przedział ufności CI) na podstawie wyników CSOM wynosiła 0,74 (od -0,02 do 1,50), w porównaniu z wartością -0,35 (od -0,98 do 0,28) uzyskaną w badaniu z meloksykamem podawanym codziennie w dawce 0,035 mg/kg[6]. Wyniki FMPI wykazywały podobną tendencję, ale rozgraniczenie między grupą placebo a grupami, którym podano badany lek, było mniej wyraźne. Oceną wielkości wskaźnika FMPI zajmowano się w kilku wcześniejszych badaniach i stwierdzono, że poprawa jest widoczna i wiarygodna[12,16], ale w jednym badaniu, przeprowadzonym na stosunkowo małej liczbie kotów[17], nie wykazano responsywności. Jednakże w większym badaniu, poświęconemu meloksykamowi[6,7], stwierdzono (przy użyciu monitorów aktywności) pewną responsywność i trafność kryterialną FMPI. Instrument CSOM pozwolił na wykrycie efektu zastosowanego leku w porównaniu z placebo, ale tylko w większym, niedawno przeprowadzonym przez nas badaniu, w którym stosowano meloksykam z grupy NLPZ[6,7] oraz w małym badaniu pilotażowym z udziałem kotów z wysokim stopniem niesprawności ruchowej[8]. Konieczne są dalsze działania zmierzające do opracowania instrumentów oceny wyników leczenia przez właściciela lub projektów badań, dzięki którym możliwe będzie wyraźne odróżnienie efektów leczenia w porównaniu z placebo i wykazanie trafności kryterialnej. Jedną z przyczyn frustracji przy opracowywaniu instrumentów do oceny przez właściciela jest to, że nie wiadomo, czy środki przeciwbólowe (do tej pory leki NLPZ), wykorzystywane przy opracowywaniu subiektywnych instrumentów, rzeczywiście działają. Uważamy, że taka skuteczność badanego leku, jaką stwierdzono w prezentowanym tutaj badaniu, pozwala domniemywać, że może to być obecnie najlepszy dostępny lek, który mógłby służyć do udoskonalania instrumentów do oceny przez właściciela; należy jednak wziąć pod uwagę wpływ różnych dróg podania (doustnie lub przez wstrzyknięcie) i częstotliwości stosowania (jednorazowo lub codziennie).

W naszym badaniu okazało się, na podstawie wyników aktywności mierzonej w sposób obiektywny, że czas trwania efektu terapeutycznego wynosi około 6 tygodni. Jest to okres podobny do czasu utrzymywania się skuteczności po podaniu tego leku psom[18] – dożylnie, w dawce 0,2 mg/kg, wynoszącego co najmniej 4 tygodnie, chociaż w tym badaniu z udziałem psów, obserwacje po podaniu leku prowadzono tylko przez okres 4 tygodni. Na podstawie badań z udziałem ludzi, wydaje się, że czas utrzymywania się skuteczności jest w pewnym stopniu zależny od dawki[10], przy czym dawki 100 i 200 µg/kg wykazują skuteczność przez okres do 8 tygodni, chociaż wygląda na to, że skuteczność po 8 tygodniach jest niższa niż po 4 tygodniach[19]. Podawany w literaturze czas utrzymywania się skuteczności zależy w pewnej mierze od projektu badania, jak również od tego, w jakich odstępach czasowych dokonuje się oceny wyników leczenia. Nasze badanie zostało zaprojektowane w taki sposób, by zbieranie wyników pomiaru aktywności odbywało się w dłuższym okresie, niż spodziewany czas działania leku, co dało nam możliwość zebrania pełniejszych danych dotyczących utrzymywania się skuteczności. Uważamy, że lek, który po pojedynczym podaniu drogą podskórną skutecznie kontroluje ból przewlekły u kotów przez około 6 tygodnie, może przynieść bardzo pozytywne i istotne klinicznie efekty w medycynie weterynaryjnej.

Toksyczność jest problemem, któremu zawsze poświęca się wiele uwagi, zwłaszcza w przypadku nowych leków. W badaniach poświęconych stosowaniu przeciwciał anty-NGF w leczeniu ludzi, zgłaszane zdarzenia niepożądane wydają się być na ogół łagodne, ale – podobnie jak w przypadku skuteczności – zależne od dawki[10,20]. Wydaje się, że większość zdarzeń niepożądanych, które można by uznać za mające związek z przeciwciałami skierowanymi przeciw NGF, dotyczą przejściowych zaburzeń sensorycznych[20]. W naszym badaniu z udziałem psów, nie stwierdziliśmy występo-

wania jakichkolwiek zdarzeń niepożądanych natury neurologicznej[17], chociaż ocena zdarzeń niepożądanych nie była celem tego badania. Ponadto, stosując ilościową ocenę progu odczuwania (QST), nie stwierdziliśmy żadnego wpływu na doznania u psów (obserwacje niepublikowane). W opisywanym tutaj badaniu nie zaobserwowano żadnych neurologicznych AE. U 1 kota, u którego wystąpiło pogorszenie funkcji nerek, nie znaleźliśmy – w oparciu o aktualny stan wiedzy – żadnych dowodów na jakikolwiek związek z leczeniem przeciwciałem monoklonalnym. Nie ma żadnych doniesień naukowych, które wskazywałyby na wystąpienie u jakiegoś gatunku toksycznego oddziaływania na nerki stosowanych w celach leczniczych przeciwciał anty-NGF, ale w przypadku kotów zagadnienie to wymaga poświęcenia szczególnej uwagi, ze względu na wysoką częstość występowania u nich przewlekłej choroby nerek[3]. Aby w pełni ocenić bezpieczeństwo stosowania NV-02 u kotów, niezbędne jest przeprowadzenie większej liczby badań, w tym dotyczących także wielokrotnego podawania badanego leku. Już po przygotowaniu prezentowanego tutaj sprawozdania z badania, Rada ds. Nazewnictwa Produktów Leczniczych w Stanach Zjednoczonych (USAN Council) przyjęła dla przeciwciała monoklonalnego anty-NGF NV-02 niezastrzeżoną nazwę frunevetmab.

Wnioski

U kotów z bólem i upośledzeniem mobilności związanymi z DJD zaobserwowano pozytywne efekty po jednokrotnym podaniu drogą podskórną NV-02, felinizowanego przeciwciała anty-NGF. Te pozytywne efekty, oceniane w sposób obiektywny – przez pomiar aktywności, utrzymywały się przez okres do 6 tygodni. Wydaje się, że NV-02 jest bardzo obiecującym lekiem do stosowania w celu długotrwałego łagodzenia bólu związanego z DJD u kotów. Uzasadnione jest dalsze prowadzenie badań klinicznych.

Przypis

[a] Actical, Philips Respironics, Bend, Oregon, USA

Podziękowania

Autorzy wyrażają wdzięczność Lyndy Harden z zespołu Clinical Studies Core NCSU-CVM za przeprowadzenie kontroli jakości danych. Autorzy dziękują dr Rachel E. Cianciolo z International Veterinary Renal Pathology Service za zbadanie za pomocą mikroskopu elektronowego jednej nerki.

Deklaracja dotycząca konfliktu interesów: ME Gruen otrzymała wsparcie finansowe – Ruth L. Kirschstein National Research Service Award (T32OD011130) – od Narodowego Instytutu Zdrowia. BDX Lascelles jest zatrudniony przez Nexvet jako konsultant. DP Gearing jest pracownikiem Nexvet. Badanie otrzymało wsparcie od firmy Nexvet Biopharma.

Deklaracja dotycząca stosowania leków przeciwdrobnoustrojowych poza wskazaniami: Autorzy deklarują, że w badaniach nie stosowano leków przeciwdrobnoustrojowych w celach innych niż wymienione we wskazaniach.

Piśmiennictwo

1. Slingerland LI, Hazewinkel HAW, Meij BP, et al. Crosssectional study of the prevalence and clinical features of osteoarthritis in 100 cats. Vet J 2011;187:304–309.

2. Lascelles BDX, Henry JB, Brown J, et al. Cross-sectional study of the prevalence of radiographic degenerative joint disease in domesticated cats. Vet Surg 2010;39:535–544.

3. Marino CL, Lascelles BDX, Vaden SL, et al. Prevalence and classification of chronic kidney disease in cats randomly selected from four age groups and in cats recruited for degenerative joint disease studies. J Feline Med Surg 2013;16:465–472.

4. Gunew M, Menrath V, Marshall R. Long-term safety, efficacy and palatability of oral meloxicam at 0.01–0.03 mg/kg for treatment of osteoarthritic pain in cats. J Feline Med Surg 2008;10:235–241.

5. Gowan RA, Lingard AE, Johnston L, et al. Retrospective case–control study of the effects of long-term dosing with meloxicam on renal function in aged cats with degenerative joint disease. J Feline Med Surg 2011;13:752–761.

6. Gruen ME, Griffith EH, Thomson AE, et al. Criterion validation testing of clinical metrology instruments for measuring degenerative joint disease associated mobility impairment in cats. PLoS ONE 2015;10:e0131839.

7. Gruen ME, Griffith E, Thomson A, et al. Detection of clinically relevant pain relief in cats with degenerative joint disease associated pain. J Vet Intern Med 2014;28:346–350.

8. Lascelles BDX, Hansen BD, Roe S, et al. Evaluation of client- specific outcome measures and activity monitoring to measure pain relief in cats with osteoarthritis. J Vet Intern Med 2007;21:410–416.

9. Seidel MF, Wise BL, Lane NE. Nerve growth factor: An update on the science and therapy. Osteoarthritis Cartilage 2013; 21:1223–1228.

10. Schnitzer TJ, Marks JA. A systematic review of the efficacy and general safety of antibodies to NGF in the treatment of OA of the hip or knee. Osteoarthritis Cartilage 2015;23(Suppl 1):S8–S17.

11. Gearing DP, Huebner M, Virtue ER, et al. In vitro and in vivo characterization of a fully felinized therapeutic anti-nerve growth factor monoclonal antibody for the treatment of pain in cats J Vet Intern Med 2016. DOI: 10.1111/jvim.13985 [E-pub ahead of Print].

12. Gruen ME, Jiamachello KN, Thomson A, Lascelles BDX. Clinical trials involving cats: What factors affect owner participation? J Feline Med Surg 2014;16:727–735.

13. Zamprogno H, Hansen BD, Bondell HD, et al. Item generation and design testing of a questionnaire to assess degenerative joint disease-associated pain in cats. Am J Vet Res 2010;71:1417–1424.

14. Lascelles BDX, Dong Y-H, Marcellin-Little DJ, et al. Relationship of orthopedic examination, goniometric measurements, and radiographic signs of degenerative joint disease in cats. BMC Vet Res 2012;8:10.

15. Lascelles BDX, Hansen BD, Thomson A, et al. Evaluation of a digitally integrated accelerometer-based activity monitor for the measurement of activity in cats. Vet Anaesth Analg 2008;35: 173–183.

16. Benito J, DePuy V, Hardie E, et al. Reliability and discriminatory testing of a client--based metrology instrument, feline musculoskeletal pain index (FMPI) for the evaluation of degenerative joint disease-associated pain in cats. Vet J 2013;196:368–373.

17. Benito J, Hansen B, DePuy V, et al. Feline musculoskeletal pain index: Responsiveness and testing of criterion validity. J Vet Intern Med 2013;27:474–482.

18. Lascelles BDX, Knazovicky D, Case B, et al. A caninespecific anti-nerve growth factor antibody alleviates pain and improves mobility and function in dogs with degenerative joint disease-associated pain. BMC Vet Res 2015;11:101.

19. Lane NE, Schnitzer TJ, Birbara CA, et al. Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee. N Engl J Med 2010;363:1521–1531.

20. Bannwarth B, Kostine M. Targeting Nerve Growth Factor (NGF) for pain management: What does the future hold for NGF antagonists? Drugs 2014;74:619–626.