



(10) 申请公布号 CN 113244387 A

(43) 申请公布日 2021.08.13

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

A61P 25/06 (2006.01)

201580025693.2 2015.03.20

地址 瑞士拉珀斯维尔-乔纳

H·斯特恩 M·常

72002

权利要求书1页 说明书89页

序列表33页 附图17页

针对降钙素基因相关肽的拮抗剂抗体及其使用方法

本发明的特征是通过施用抗CGRP拮抗剂抗体来预防或治疗CGRP相关疾病,诸如血管舒缩症状和/或头痛(例如,偏头痛、丛集性头痛和紧张性头痛)的方法。本发明还提供用于所公开的方法的组合物。本发明还描述了拮抗剂抗体G1和来源于针对CGRP的G1的抗体。

[illegible]

1. 一种治疗或减少受试者中的头痛的发作的方法,其包括在多天将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体施用于所述受试者,其中在所述多天中的每天施用的量介于100-2000mg之间。

2. 一种治疗或减少受试者中的至少一种血管舒缩症状的发作的方法,其包括在多天将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体施用于所述受试者,其中在所述多天中的每天施用的量介于100-2000mg之间。

3. 一种减少受试者经历的每月头痛小时数的方法,其包括将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体施用于所述受试者,其中所述单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛小时数至少20小时。

4. 一种减少受试者经历的每月头痛小时数的方法,其包括将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体施用于所述受试者,其中所述单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛小时数至少15%。

5. 一种减少受试者经历的每月头痛天数的方法,其包括将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体施用于所述受试者,其中所述单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛天数至少3天。

6. 一种在受试者中减少抗头痛药的使用的方法,其包括将调节CGRP途径的单克隆抗体施用于所述受试者,其中所述单克隆抗体的量能够有效减少所述受试者每月使用所述抗头痛药至少15%。

7. 一种治疗或减少受试者中头痛的发作的方法,其包括以调节CGRP途径的量将单剂量的单克隆抗体施用于所述受试者,其中所述单克隆抗体的量介于100-2000mg之间。

8. 一种组合物,其根据前述权利要求中任一项使用。

针对降钙素基因相关肽的拮抗剂抗体及其使用方法

[0001] 本申请为申请日为2015年3月20日、申请号为201580025693.2、发明名称为“针对降钙素基因相关肽的拮抗剂抗体及其使用方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2014年3月21日提交的美国临时专利申请No.61/968,897、2014年11月24日提交的美国临时专利申请No.62/083,809和2015年2月23日提交的美国临时专利申请No.62/119,778的优先权,这些专利申请就所有目的而言全文以引用方式并入本文。

[0004] 发明背景

[0005] CGRP(降钙素基因相关肽)是37个氨基酸的神经肽,它属于包括降钙素、肾上腺髓质素和糊精的肽家族。在人体中,存在两种形式的CGRP(α -CGRP和 β -CGRP),并且它们具有相似的活性。它们有三个氨基酸的不同,并且表现出不同的分布。至少两种CGRP受体亚型也可导致有差异的活性。CGRP是中枢神经系统中的神经递质,并且已显示是外周中有效的血管舒张剂,其中在外周含CGRP的神经元与血管紧密结合。作为导致血浆外渗和微脉管系统血管舒张的事件级联的一部分,CGRP介导的血管舒张也与神经源性炎症相关,并且存在于偏头痛中。

[0006] CGRP因其与血管舒缩症状的可能联系而受到关注(Wyon等, Scand.J.Urol.Nephrol.35:92-96(2001);Wyon等,Menopause 7(1):25-30(2000))。血管舒缩症状(VMS),诸如热潮红和盗汗,是与绝经相关的最常见症状,发生在自然或手术诱导绝经的所有女性的60%至80%中。热潮红可能是中枢神经系统(CNS)对性类固醇减退的适应性应答(Freedman Am.J.Human Biol.13:453-464(2001))。迄今为止,对于潮红的最有效的疗法是基于激素的治疗,所述激素包括雌激素和/或一些孕酮。激素治疗可有效减轻潮红,但是不适合所有女性。观察到的心理和情绪症状(诸如神经质、疲劳、易怒、失眠、抑郁、失忆、头痛、焦虑、神经质或注意力不集中)被认为是由热潮红和盗汗后的睡眠剥夺引起的(Kramer等,载于:Murphy等,第3增刊Int'l Symposium on Recent Advances in Urological Cancer Diagnosis and Treatment-Proceedings,Paris,France:SCI:3-7(1992))。

[0007] 男性在类固醇激素(雄性激素)减少后也经历热潮红。在年龄相关的雄性激素减退的情况下(Katovich等,Proceedings of the Society for Experimental Biology& Medicine,1990,193(2):129-35)以及在前列腺癌治疗相关的激素剥夺的极端情况下(Berendsen等,European Journal of Pharmacology,2001,419(1):47-54)也如此。这些患者的三分之一会经历足够严重到引起明显不适和不便的长期和频繁症状。

[0008] CGRP是涉及其它血管舒缩症状的病理性有效的血管舒张剂,所述症状诸如所有形式的血管性头痛,包括偏头痛(有前兆或无前兆)和丛集性头痛。Durham, N.Engl.J.Med.350:1073-1075,2004。患者偏头痛期间外颈静脉中CGRP的血清水平升高。Goadsby等,Ann.Neurol.28:183-7,1990。静脉内施用人 α -CGRP在患有无前兆偏头痛的患者中诱导了头痛和偏头痛,暗示CGRP在偏头痛中具有引发作用。Lassen等,Cephalalgia 22:54-61,2002。

[0009] CGRP与偏头痛的可能相关性已是开发和测试多种下述化合物的基础,所述化合物抑制CGRP的释放(例如,舒马曲坦)、拮抗CGRP受体(例如,二肽衍生物BIBN4096BS (Boehringer Ingelheim)、CGRP(8-37))或与一种或多种受体相关蛋白相互作用,所述受体相关蛋白诸如受体活性膜蛋白(RAMP)或受体组分蛋白(RCP),这两种蛋白均影响CGRP与其受体的结合。Brain, S.等, Trends in Pharmacological Sciences 23:51-53, 2002。 α -2肾上腺素受体亚型和腺苷A1受体也控制(抑制)CGRP的释放和三叉神经活化(Goadsby等, Brain 125:1392-401, 2002)。腺苷A1受体激动剂GR79236 (metrafadil) (已显示出在人体中抑制神经源性血管舒张和三叉神经伤害感受)也可具有抗偏头痛活性(Arulmani等, Cephalalgia 25:1082-1090, 2005; Giffin等, Cephalalgia 23:287-292, 2003。)

[0010] 以下观察反驳了该理论:用专门抑制神经源性炎症(例如,速激肽NK1受体拮抗剂)或三叉神经活化(例如,5HT_{1D}受体激动剂)的化合物治疗显示作为偏头痛的急性治疗相对无效,引起一些研究人员质疑CGRP释放的抑制是否为有效的抗偏头痛治疗的主要作用机制。Arulmani等, Eur. J. Pharmacol. 500:315-330, 2004。

[0011] 偏头痛是复杂的、常见的神经病症,其特征在于严重、偶发性头痛发作和相关的症状,所述症状可包括恶心、呕吐,对光、声音或运动敏感。在一些患者中,头痛之前有或伴有前兆。头痛可以是严重的,并且在某些患者中也可以是单侧的。

[0012] 偏头痛发作对日常生活是破坏性的。在美国和西欧,偏头痛患者的总体患病率在一般人群中为11%(6%男性;15-18%女性)。此外,在个体中发作的中位频率是1.5次/月。虽然有多种治疗可用于缓解或减轻症状,但是推荐每个月偏头痛发作超过3-4次的那些患者采用预防性治疗。Goadsby等, New Engl. J. Med. 346(4):257-275, 2002。

[0013] 用于治疗偏头痛的药理学干预的多样性和患者间应答的可变性是该疾病的不同本质的证明。因此,表现出5-羟色胺能以及肾上腺素能、去甲肾上腺素能和多巴胺能活性的相对非选择性药物诸如麦角生物碱(例如,麦角胺、二氢麦角胺、美西麦角)用于治疗偏头痛已经超过八十年。其它治疗包括阿片制剂(例如,羟考酮)和 β -肾上腺素能拮抗剂(例如,普萘洛尔)。一些患者(通常是具有较轻症状的那些患者)能够用非处方药物控制它们的症状,所述非处方药诸如一种或多种非甾体抗炎剂(NSAID),诸如阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因的组合(例如, Excedrin® Migraine)。

[0014] 近来,使用托吡酯治疗过一些偏头痛患者,托吡酯是阻断电压依赖性钠通道和某些谷氨酸受体(AMPA-红藻氨酸)、增强GABA-A受体活性以及阻断碳酸酐酶的抗惊厥剂。相对更近地,5-羟色胺5HT-1B/1D和/或5HT-1a受体激动剂(诸如,舒马曲坦)的成功,在一些患者中已经引起研究人员提出了该疾病的5-羟色胺能病因论。不幸的是,虽然一些患者对该治疗的反应良好,但是其它患者对其作用有相对的耐受性。

[0015] 假定胺能脑干细胞核中的离子通道功能障碍导致该疾病,然而偏头痛的精确病理生理学仍未被充分理解。一种形式的偏头痛(家族性偏瘫偏头痛)已经显示出与电压门控P/Q-型钙通道的 α 1亚基中的错义突变相关,并且据认为很可能其它离子通道突变也存在于其它患者群体中。虽然血管扩张与偏头痛相关并且加重了其疼痛症状,但是此类神经血管事件目前被认为是该病症的结果,而不是起因。总之,调节感觉输入的脑干途径的功能障碍被认为是偏头痛的统一特征。Goadsby, P. J.等, New Engl. J. Med. 346(4):257-275, 2002。

发明内容

[0016] 在一些方面,本文公开的发明涉及抗CGRP拮抗剂抗体以及使用抗CGRP拮抗剂抗体治疗或预防血管舒缩症状的方法。本文提供了血管舒缩症状的实例,诸如热潮红。在一些情况下,抗CGRP拮抗剂抗体用于治疗或预防头痛,诸如有前兆或无前兆的偏头痛、偏瘫偏头痛、丛集性头痛、偏头痛性神经痛、慢性头痛、紧张性头痛以及其它医学病症(诸如由肿瘤引起的感染或颅内压升高)导致的头痛。

[0017] 在一个方面,本发明提供用于治疗或预防个体中至少一种血管舒缩症状的方法,其包括将有效量的抗CGRP拮抗剂抗体施用于个体。

[0018] 在一个方面,本发明提供用于治疗或预防个体中头痛(例如,偏头痛和丛集性头痛)的方法,其包括将有效量的抗CGRP拮抗剂抗体施用于个体。

[0019] 在另一个方面,本发明提供用于改善、控制、减少个体中头痛(例如,偏头痛和丛集性头痛)的发作或延迟头痛的发展或进展的方法,其包括将有效量的抗CGRP拮抗剂抗体施用于个体。

[0020] 在一个方面,本发明提供治疗或减少受试者中至少一种血管舒缩症状和/或头痛的发作的方法。在一个实施方案中,该方法包括在多天将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体(例如,单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于该受试者,其中在所述多天中的每天施用的量小于1000mg。在一个实施方案中,该方法包括在多天将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体(例如,单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于该受试者,其中在所述多天中的每天施用的量介于100-2000mg之间。在一些实施方案中,该头痛是偏头痛(例如,慢性偏头痛或偶发性偏头痛)。在一些实施方案中,所述多天中的两天相隔超过七天。在一些实施方案中,在单次施用后头痛的发作减少至少七天。在一些实施方案中,在第一天施用的单克隆抗体的量不同于(例如,大于)在第二天施用的单克隆抗体的量。在一些实施方案中,给该受试者施用小于3剂/月。在一些实施方案中,该施用是皮下施用。在一些实施方案中,该施用是静脉内施用。在一些实施方案中,该施用包括利用包含一定量的单克隆抗体的预填充注射器。在一些实施方案中,该单克隆抗体配制为150mg/mL的浓度。在一些实施方案中,该单克隆抗体以小于2mL的体积施用。在一些实施方案中,单克隆抗体的量小于1000mg。在一些实施方案中,在所述施用后受试者经历的每月头痛小数从受试者的施用前水平减少40或更多个小时(例如45、50、55、60、65、70、75、80或更多)。每月头痛小时数可减少超过60小时。在一些实施方案中,在所述施用后受试者经历的每月头痛小时数相对于受试者的施用前水平减少25%或更多(例如30%、35%、40%、45%、50%或更多)。每月头痛小时数可减少40%或更多。在一些实施方案中,在所述施用后受试者经历的每月头痛天数从受试者的施用前水平减少3天或更多天(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多天)。在一些实施方案中,该方法还包括将第二药剂(agent)与单克隆抗体同时或贯序(sequentially)施用于受试者。该第二药剂可以是5-HT₁激动剂、曲坦(triptan)、麦角生物碱和非甾类抗炎药物中的任一者。在一些实施方案中,该第二药剂是受试者预防性摄取的药剂。在一些实施方案中,在施用单克隆抗体后,受试者每月使用第二药剂减少至少15%。在一些实施方案中,该第二药剂是曲坦。在一些实施方案中,该受试者是人。在一些实施方案中,该单克隆抗体是人或人源化单克隆抗体。在一些实施方案中,该单克隆抗体包括(a)具有如SEQ ID NO:3示出的CDR H1、如SEQ ID NO:4示出的CDR H2、如SEQ ID NO:5示出的CDR H3、如SEQ ID NO:6

示出的CDR L1、如SEQ ID NO:7示出的CDR L2和如SEQ ID NO:8示出的CDR L3的抗体；或(b)如表6示出的根据(a)的抗体的变体。

[0021] 在一个方面，本发明提供减少受试者经历的每月头痛小时数的方法。在一个实施方案中，该方法包括将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体施用于受试者，其中该单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛小时数至少20小时（例如25、30、35、40、45、50、55、60、65、70或更多个头痛小时）。在一些实施方案中，每月头痛小时数减少至少约50小时。在一个实施方案中，该方法包括将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体施用于受试者，其中该单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛小时数至少15%（例如20%、25%、30%、35%、40%或更多）。在一些实施方案中，每月头痛小时数减少至少约30%。在一些实施方案中，该单克隆抗体是抗CGRP拮抗剂抗体。在一些实施方案中，单克隆抗体的量小于1000mg。在一些实施方案中，给该受试者施用小于3剂/月。在一些实施方案中，该施用是皮下或静脉内施用。在一些实施方案中，该单克隆抗体配制为至少150mg/mL的浓度。在一些实施方案中，其中该单克隆抗体以小于2mL的体积施用。在一些实施方案中，该受试者是人。在一些实施方案中，该单克隆抗体是人的或人源化的。在一些实施方案中，该单克隆抗体包括(a)具有如SEQ ID NO:3示出的CDR H1、如SEQ ID NO:4示出的CDR H2、如SEQ ID NO:5示出的CDR H3、如SEQ ID NO:6示出的CDR L1、如SEQ ID NO:7示出的CDR L2和如SEQ ID NO:8示出的CDR L3的抗体；或(b)如表6示出的根据(a)的抗体的变体。

[0022] 在一个方面，本发明提供减少受试者经历的每月头痛天数的方法。在一个实施方案中，该方法包括将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体施用于受试者，其中该单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛天数至少3天（例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个头痛天）。在一些实施方案中，每月头痛天数减少至少约6个头痛天。在一些实施方案中，该单克隆抗体是抗CGRP拮抗剂抗体。在一些实施方案中，单克隆抗体的量小于1000mg。在一些实施方案中，给该受试者施用小于3剂/月。在一些实施方案中，该施用是皮下或静脉内施用。在一些实施方案中，该单克隆抗体配制为至少150mg/mL的浓度。在一些实施方案中，其中该单克隆抗体以小于2mL的体积施用。在一些实施方案中，该受试者是人。在一些实施方案中，该单克隆抗体是人的或人源化的。在一些实施方案中，该单克隆抗体包括(a)具有如SEQ ID NO:3示出的CDR H1、如SEQ ID NO:4示出的CDR H2、如SEQ ID NO:5示出的CDR H3、如SEQ ID NO:6示出的CDR L1、如SEQ ID NO:7示出的CDR L2和如SEQ ID NO:8示出的CDR L3的抗体；或(b)如表6示出的根据(a)的抗体的变体。

[0023] 在一个方面，本发明提供减少受试者中抗头痛药的使用的方法，其包括将调节CGRP途径的单克隆抗体（例如，抗CGRP拮抗剂抗体）施用于受试者，其中该单克隆抗体的量能够有效减少受试者每月使用抗头痛药至少15%（例如20%、25%、30%、35%、40%或更多）。在一些实施方案中，该抗头痛药选自5-HT₁激动剂、曲坦、阿片制剂、 β -肾上腺素能拮抗剂、麦角生物碱和非甾类抗炎药物(NSAID)。在一些实施方案中，该抗头痛药是曲坦。在一些实施方案中，单克隆抗体的量小于1000mg。在一些实施方案中，给该受试者施用小于3剂/月。在一些实施方案中，该施用是皮下或静脉内施用。在一些实施方案中，该单克隆抗体配制为至少150mg/mL的浓度。在一些实施方案中，其中该单克隆抗体以小于2mL的体积施用。在一些实施方案中，该受试者是人。在一些实施方案中，该单克隆抗体是人的或人源化的。在一些实施方案中，该单克隆抗体包括(a)具有如SEQ ID NO:3示出的CDR H1、如SEQ ID

NO:4示出的CDR H2、如SEQ ID NO:5示出的CDR H3、如SEQ ID NO:6示出的CDR L1、如SEQ ID NO:7示出的CDR L2和如SEQ ID NO:8示出的CDR L3的抗体；或(b)如表6示出的根据(a)的抗体的变体。

[0024] 在一个方面，本发明提供治疗或减少受试者中头痛(例如，偏头痛)的发作的方法，其包括以调节CGRP途径的量将单剂的单克隆抗体(例如，单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者，其中该单克隆抗体的量介于100-2000mg之间。

[0025] 在另一个实施方案中，本发明提供用于改善、控制、减少个体中头痛(例如，偏头痛和丛集性头痛)的发作或延迟头痛的发展或进展的方法，其包括将有效量的抗CGRP拮抗剂抗体与至少一种用于治疗头痛的另外的药剂组合施用于个体。此类另外的药剂包括5-HT₁样激动剂(以及作用于其它5-HT₁位点的激动剂)和非甾类抗炎药物(NSAID)。

[0026] 可与抗CGRP抗体组合使用的5-HT₁激动剂的实例包括一类称为曲坦的化合物，诸如舒马曲坦、佐米曲坦、那拉曲坦、利扎曲坦、依立曲坦、阿莫曲坦和夫罗曲坦。还已知麦角生物碱和相关化合物具有5-HT激动剂活性，并且已用于治疗头痛(诸如偏头痛)。这些化合物包括酒石酸麦角胺、马来酸麦角新碱和甲磺酸二氢麦角碱(例如，甲磺酸二氢麦角柯宁碱、甲磺酸二氢麦角克碱、甲磺酸二氢麦角环肽和甲磺酸二氢麦角胺(DHE 45))。

[0027] 可与抗CGRP抗体组合使用的NSAID的实例包括阿司匹林、双氯芬酸、二氟尼柳、依托度酸、芬布芬、非诺洛芬、氟苯柳、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、酮咯酸、甲氯芬那酸、甲芬那酸、萘丁美酮、萘普生、噁丙嗪、苯基丁氮酮、吡罗昔康、舒林酸、托美丁或佐美酸、环加氧酶-2(COX-2)抑制剂、塞来昔布；罗非昔布；美洛昔康；JTE-522；L-745,337；NS398；或它们的药学上可接受的盐。

[0028] 在另一个方面，本发明提供用于改善、控制、减少个体中热潮红的发作或延迟热潮红的发展或进展的方法，其包括将有效量的抗CGRP拮抗剂抗体施用于个体。

[0029] 在另一个方面，本发明提供用于改善、控制、减少个体中热潮红的发作或延迟热潮红的发展或进展的方法，其包括将有效量的抗CGRP拮抗剂抗体与至少一种用于治疗热潮红的另外的药剂组合施用于个体。此类另外的药剂包括但不限于基于激素的治疗剂，所述激素包括雌激素和/或孕酮。

[0030] 在一个实施方案中，用于上文所述的任何方法的抗CGRP拮抗剂抗体是本文所述的任何抗体。

[0031] 在一些实施方案中，该抗CGRP拮抗剂抗体识别人CGRP。在一些实施方案中，该抗CGRP拮抗剂抗体结合人 α -CGRP和 β -CGRP。在一些实施方案中，该抗CGRP拮抗剂抗体结合人和大鼠CGRP。在一些实施方案中，该抗CGRP拮抗剂抗体结合具有CGRP的氨基酸25-37的C末端片段。在一些实施方案中，该抗CGRP拮抗剂抗体结合CGRP的氨基酸25-37内的C末端表位。

[0032] 在一些实施方案中，该抗CGRP拮抗剂抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中，该抗CGRP拮抗剂抗体是人源化的。在一些实施方案中，该抗体是人的。在一些实施方案中，该抗CGRP拮抗剂抗体是抗体G1(如本文所述)。在一些实施方案中，该抗CGRP拮抗剂抗体包含表6示出的抗体G1或G1的变体的一个或多个CDR(诸如一个、两个、三个、四个、五个，或在一些实施方案中，全部六个CDR)。在其它实施方案中，该抗CGRP拮抗剂抗体包含图5示出的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)和图5示出的轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0033] 在一些实施方案中，该抗体包含经修饰的恒定区，诸如免疫惰性(包括部分免疫惰

性),例如不触发补体介导的裂解,不刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),不活化小神经胶质细胞,或这些活性中的一者或多者减少的恒定区。在一些实施方案中,该恒定区如Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624;PCT专利申请No. PCT/GB99/01441;和/或英国专利申请No. 9809951.8所述经修饰。在其它实施方案中,该抗体包含含有以下突变的人重链IgG2恒定区:A330P331至S330S331(氨基酸编号参考野生型IgG2序列)。Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624。在一些实施方案中,该抗体的重链恒定区是具有任何以下突变的人重链IgG1:1) A327A330P331至G327S330S331;2) E233L234L235G236 (SEQ ID NO:48) 至P233V234A235,其中G236缺失;3) E233L234L235至P233V234A235;4) E233L234L235G236A327A330P331 (SEQ ID NO:49) 至P233V234A235G327S330S331 (SEQ ID NO:50),其中G236缺失;5) E233L234L235A327A330P331 (SEQ ID NO:51) 至P233V234A235G327S330S331 (SEQ ID NO:50);以及6) N297至A297或除N之外的任何其它氨基酸。在一些实施方案中,该抗体的重链恒定区是具有任何以下突变的人重链IgG4:E233F234L235G236 (SEQ ID NO:52) 至P233V234A235,其中G236缺失;E233F234L235至P233V234A235;以及S228L235至P228E235。

[0034] 在其它实施方案中,该恒定区未经N-连接糖基化。在一些实施方案中,该恒定区由于低聚糖连接残基(诸如Asn297)和/或作为恒定区中N-糖基化识别序列的一部分的侧翼残基的突变而未经N-连接糖基化。在一些实施方案中,该恒定区是未经N-连接糖基化的。该恒定区可以是由于酶切或在糖基化缺陷宿主细胞中表达而未经N-连接糖基化。

[0035] 抗CGRP拮抗剂抗体与CGRP(诸如人 α -CGRP,如通过表面等离子共振在适当的温度,诸如25或37°C下所测定)的结合亲和力(K_D)可为约0.02至约200nM。在一些实施方案中,该结合亲和力为约200nM、约100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM、约60pM、约50pM、约20pM、约15pM、约10pM、约5pM或约2pM中的任一者。在一些实施方案中,该结合亲和力小于约250nM、约200nM、约100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM或约50pM中的任一者。在一些实施方案中,该结合亲和力小于约50nM。

[0036] 该抗CGRP拮抗剂抗体可在头痛之前、期间和/或之后施用。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体在头痛(例如,偏头痛和丛集性头痛)发作之前施用。抗CGRP拮抗剂抗体的施用可通过本领域已知的任何方式进行,包括:口服、静脉内、皮下、动脉内、肌肉内、鼻内(例如,吸入或非吸入)、心内、脊柱内、胸内、腹膜内、心室内、舌下、经皮和/或通过吸入施用。施用可以是全身的,例如静脉内,或局部的。

[0037] 在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体可与另一种药剂,诸如用于治疗头痛的另一种药剂联合施用。

[0038] 在另一个方面,本发明提供用于制造药剂的抗CGRP拮抗剂抗体的用途,所述药剂用于本文所述的任何方法,例如用于治疗或预防头痛。

[0039] 在另一个方面,本发明提供用于预防或治疗头痛(例如,偏头痛和丛集性头痛)的药物组合物,其包含与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合的有效量的抗CGRP拮抗剂抗体。

[0040] 在另一个方面,本发明提供用于本文所述的任何方法的试剂盒。在一些实施方案中,该试剂盒包括容器、包含与药学上可接受的载体组合的本文所述的抗CGRP拮抗剂抗体的组合物,以及将组合物用于本文所述的任何方法的说明。

[0041] 本发明还提供来源于表6示出的抗体G1或其变体的抗CGRP拮抗剂抗体和多肽。因此,在一个方面,本发明提供通过具有ATCC登录号PTA-6866和PTA-6867的表达载体制备的抗体G1(可互换地称为“G1”)。例如,在一个实施方案中是通过具有ATCC登录号PTA-6867的表达载体制备的包含重链的抗体。在另一个实施方案中是通过具有ATCC登录号PTA-6866的表达载体制备的包含轻链的抗体。G1的重链和轻链可变区的氨基酸序列如图5所示。抗体G1的互补性决定区(CDR)部分(包括Chothia和Kabat CDR)也如图5所示。应当理解,提及G1的任何部分或整个区涵盖通过具有ATCC登录号PTA-6866和PTA-6867的表达载体制备的序列,和/或图5描绘的序列。在一些实施方案中,本发明还提供具有表6描绘的氨基酸序列的G1的抗体变体。

[0042] 在一个方面,本发明提供包含与SEQ ID NO:1具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的氨基酸序列相同性的 V_H 结构域的抗体。

[0043] 在另一个方面,本发明提供包含与SEQ ID NO:2具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的氨基酸序列相同性的 V_L 结构域的抗体。

[0044] 在另一个方面,本发明提供包含表6示出的抗体G1或其变体的片段或区的抗体。在一个实施方案中,该片段是抗体G1的轻链。在另一个实施方案中,该片段是抗体G1的重链。在又一个实施方案中,该片段包含抗体G1的轻链和/或重链的一个或多个可变区。在又一个实施方案中,该片段包含图5示出的轻链和/或重链的一个或多个可变区。在又一个实施方案中,该片段包含抗体G1的轻链和/或重链的一个或多个CDR。

[0045] 在另一个方面,本发明提供包含SEQ ID NO:5示出的 V_H CDR3,或与SEQ ID NO:5相差1、2、3、4或5个氨基酸取代的序列的多肽(其可以是或可以不是抗体)。在具体实施方案中,此类氨基酸取代是保守取代。

[0046] 在另一个方面,本发明提供包含SEQ ID NO:8示出的 V_L CDR3,或与SEQ ID NO:8相差1、2、3、4或5个氨基酸取代的序列的多肽(其可以是或可以不是抗体)。在具体实施方案中,此类氨基酸取代是保守取代。

[0047] 在另一个方面,本发明提供包含以下项中的任何一者或多者的多肽(其可以是或可以不是抗体):a)表6示出的抗体G1或其变体的一个或多个CDR;b)表6示出的抗体G1或其变体的重链的CDR H3;c)表6示出的抗体G1或其变体的轻链的CDR L3;d)表6示出的抗体G1或其变体的轻链的三个CDR;e)表6示出的抗体G1或其变体的重链的三个CDR;f)表6示出的抗体G1或其变体的轻链的三个CDR和重链的三个CDR。在一些实施方案中,本发明还提供包含以下项中的任何一者或多者的多肽(其可以是或可以不是抗体):a)来源于表6示出的抗体G1或其变体的一个或多个(一个、两个、三个、四个、五个或六个)CDR;b)来源于抗体G1的重链的CDR H3的CDR;和/或c)来源于抗体G1的轻链的CDR L3的CDR。在一些实施方案中,该CDR是图5示出的CDR。在一些实施方案中,所述来源于表6示出的抗体G1或其变体的一个或多个CDR与G1或其变体的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个CDR具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的相同性。

[0048] 在一些实施方案中,该CDR是Kabat CDR。在其它实施方案中,该CDR是Chothia CDR。在其它实施方案中,该CDR是Kabat和Chothia CDR的组合(也称为“组合CDR”或“延伸CDR”)。换句话讲,对于任何给定的包含超过一个CDR的实施方案,该CDR可以是Kabat、Chothia中的任一者,和/或它们的组合。

[0049] 在一些实施方案中,该多肽(诸如抗体)包含氨基酸序列KASKXaaVXaaTYVS (SEQ ID NO:53),其中位置5的Xaa为R、W、G、L或N;并且其中位置7的Xaa为T、A、D、G、R、S、W或V。在一些实施方案中,氨基酸序列KASKXaaVXaaTYVS (SEQ ID NO:53)是抗体轻链的CDR1。

[0050] 在一些实施方案中,该多肽(诸如抗体)包含氨基酸序列XaaXaaSNRYXaa (SEQ ID NO:54),其中位置1的Xaa是G或A;其中位置2的Xaa是A或H;并且其中位置7的Xaa是L、T、I或S。在一些实施方案中,氨基酸序列XaaXaaSNRYXaa (SEQ ID NO:54)是抗体轻链的CDR2。

[0051] 在一些实施方案中,该多肽(诸如抗体)包含氨基酸序列EIRSXaaSDXaaXaaATXaaYAXaaAVKG (SEQ ID NO:55),其中位置5的Xaa是E、R、K、Q或N;其中位置8的Xaa是A、G、N、E、H、S、L、R、C、F、Y、V、D或P;其中位置9的Xaa是S、G、T、Y、C、E、L、A、P、I、N、R、V、D或M;其中位置12的Xaa是H或F;其中位置15的Xaa是E或D。在一些实施方案中,氨基酸序列EIRSXaaSDXaaXaaATXaaYAXaaAVKG (SEQ ID NO:55)是抗体重链的CDR2。

[0052] 在一些实施方案中,该多肽(诸如抗体)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:1的位置99的氨基酸残基是L或被A、N、S、T、V或R取代;并且其中SEQ ID NO:1的位置100的氨基酸残基是A或被L、R、S、V、Y、C、G、T、K或P取代。

[0053] 在一些实施方案中,该抗体是人抗体。在其它实施方案中,该抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,该抗体是单克隆的。在一些实施方案中,该抗体(或多肽)是分离的。在一些实施方案中,该抗体(或多肽)是基本上纯的。

[0054] 该抗体的重链恒定区可来自任何类型的恒定区,诸如IgG、IgM、IgD、IgA和IgE;以及任何同种型,诸如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0055] 在一些实施方案中,该抗体包含本文所述的经修饰的恒定区。

[0056] 在另一个方面,本发明提供这样的多核苷酸(其可以是分离的):其包括编码表6示出的抗体G1或其变体的片段或区的多核苷酸。在一个实施方案中,该片段是抗体G1的轻链。在另一个实施方案中,该片段是抗体G1的重链。在又一个实施方案中,该片段包含抗体G1的轻链和/或重链的一个或多个可变区。在又一个实施方案中,该片段包含抗体G1的轻链和/或重链的一个或多个(即,一个、两个、三个、四个、五个或六个)互补性决定区(CDR)。

[0057] 在另一个方面,本发明提供这样的多核苷酸(其可以是分离的):其包括编码表6示出的抗体G1或其变体的多核苷酸。在一些实施方案中,该多核苷酸包括SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10示出的任何一种或两种多核苷酸。

[0058] 在另一个方面,本发明提供编码本文所述的任何抗体(包括抗体片段)或多肽的多核苷酸。

[0059] 在另一个方面,本发明提供包含本文所公开的任何多核苷酸的载体(包括表达和克隆载体)和宿主细胞。在一些实施方案中,该载体是具有ATCC No. PTA-6867的pDb.CGRP.hFcGI。在其它实施方案中,该载体是具有ATCC No. PTA-6866的pEb.CGRP.hKGI。

[0060] 在另一个方面,本发明提供包含编码本文所述的任何抗体的多核苷酸的宿主细胞。

[0061] 在另一个方面,本发明提供本文所述的任何抗体或多肽与CGRP结合的复合物。在一些实施方案中,该抗体是表6示出的抗体G1或其变体。

[0062] 在另一个方面,本发明提供包含有效量的本文所述的任何多肽(包括抗体,诸如包含抗体G1的一个或多个CDR的抗体)或多核苷酸和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0063] 在另一个方面,本发明提供产生抗体G1的方法,其包括在允许生成抗体G1的条件下培养宿主细胞或其子代,其中该宿主细胞包含编码抗体G1的表达载体;以及在一些实施方案中,纯化该抗体G1。在一些实施方案中,该表达载体包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10示出的多核苷酸序列中的一者或两者。

[0064] 在另一个方面,本发明提供产生本文所述的任何抗体或多肽的方法,该方法通过在合适的细胞中表达编码抗体(其可以单个轻链或重链单独表达,或轻链和重链二者从一个载体表达)或多肽的一种或多种多核苷酸,一般地然后回收和/或分离所关注的抗体或多肽来进行。

[0065] 抗CGRP拮抗剂抗体和多肽,以及编码本发明的抗体和多肽的多核苷酸可用于治疗、预防、改善、控制或减少与CGRP功能异常相关疾病的发作,诸如头痛(例如,偏头痛、丛集性头痛、慢性头痛和紧张性头痛)以及可通过拮抗CGRP活性治疗或预防的其它病症。

[0066] 在另一个方面,本发明提供包括本文所述的任何一种或多种组合物的试剂盒和组合物。这些试剂盒通常在合适的包装中并且具有适当的说明,可用于本文所述的任何方法。

[0067] 在一个方面,本发明提供根据本文所述的任何方法使用的组合物。

[0068] 在一个方面,本发明提供用于治疗或减少受试者中至少一种血管舒缩症状和/或头痛的发作的组合物。在一个实施方案中,该用途包括在多天将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体(例如,单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于该受试者,其中在所述多天中的每天施用的量小于1000mg。在一个实施方案中,该用途包括在多天将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体(例如,单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于该受试者,其中在所述多天中的每天施用的量介于100-2000mg之间。在一些实施方案中,该头痛是偏头痛(例如,慢性偏头痛或偶发性偏头痛)。在一些实施方案中,所述多天中的两天相隔超过七天。在一些实施方案中,在单次施用后头痛的发作减少至少七天。在一些实施方案中,在第一天施用的单克隆抗体的量不同于(例如,大于)在第二天施用的单克隆抗体的量。在一些实施方案中,给该受试者施用小于3剂/月。在一些实施方案中,该施用是皮下施用。在一些实施方案中,该施用是静脉内施用。在一些实施方案中,该施用包括利用包含一定量的单克隆抗体的预填充注射器。在一些实施方案中,该单克隆抗体配制为150mg/mL的浓度。在一些实施方案中,该单克隆抗体以小于2mL的体积施用。在一些实施方案中,单克隆抗体的量小于1000mg。在一些实施方案中,在所述施用后受试者经历的每月头痛小数从受试者的施用前水平减少40或更多个小时(例如45、50、55、60、65、70、75、80或更多)。每月头痛小时数可减少超过60小时。在一些实施方案中,在所述施用后受试者经历的每月头痛小时数相对于受试者中的施用前水平减少25%或更多(例如30%、35%、40%、45%、50%或更多)。每月头痛小时数可减少40%或更多。在一些实施方案中,在所述施用后受试者经历的每月头痛天数从受试者的施用前水平减少3天或更多天(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多天)。在一些实施方案中,该用途还包括将第二药剂与单克隆抗体同时或贯序施用于受试者。该第二药剂可以是5-HT₁激动剂、曲坦(triptan)、麦角生物碱和非甾类抗炎药物中的任一者。

在一些实施方案中,该第二药剂是受试者预防性摄取的药剂。在一些实施方案中,在施用单克隆抗体后,受试者每月使用第二药剂减少至少15%。在一些实施方案中,该第二药剂是曲坦。在一些实施方案中,该受试者是人。在一些实施方案中,该单克隆抗体是人或人源化单克隆抗体。在一些实施方案中,该单克隆抗体包括(a)具有如SEQ ID NO:3示出的CDR H1、如SEQ ID NO:4示出的CDR H2、如SEQ ID NO:5示出的CDR H3、如SEQ ID NO:6示出的CDR L1、如SEQ ID NO:7示出的CDR L2和如SEQ ID NO:8示出的CDR L3的抗体;或(b)如表6示出的根据(a)的抗体的变体。

[0069] 在一个方面,本发明提供用于减少受试者经历的每月头痛小时数的组合物。在一个实施方案中,该用途包括将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体施用于受试者,其中该单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛小时数至少20小时(例如25、30、35、40、45、50、55、60、65、70或更多个头痛小时)。在一些实施方案中,每月头痛小时数减少至少约50小时。在一个实施方案中,该用途包括将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体施用于受试者,其中该单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛小时数至少15%(例如20%、25%、30%、35%、40%或更多)。在一些实施方案中,每月头痛小时数减少至少约30%。在一些实施方案中,该单克隆抗体是抗CGRP拮抗剂抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体的量小于1000mg。在一些实施方案中,给该受试者施用小于3剂/月。在一些实施方案中,该施用是皮下或静脉内施用。在一些实施方案中,该单克隆抗体配制为至少150mg/mL的浓度。在一些实施方案中,其中该单克隆抗体以小于2mL的体积施用。在一些实施方案中,该受试者是人。在一些实施方案中,该单克隆抗体是人的或人源化的。在一些实施方案中,该单克隆抗体包括(a)具有如SEQ ID NO:3示出的CDR H1、如SEQ ID NO:4示出的CDR H2、如SEQ ID NO:5示出的CDR H3、如SEQ ID NO:6示出的CDR L1、如SEQ ID NO:7示出的CDR L2和如SEQ ID NO:8示出的CDR L3的抗体;或(b)如表6示出的根据(a)的抗体的变体。

[0070] 在一个方面,本发明提供用于减少受试者经历的每月头痛天数的组合物。在一个实施方案中,该用途包括将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体施用于受试者,其中该单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛天数至少3天(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个头痛天)。在一些实施方案中,每月头痛天数减少至少约6个头痛天。在一些实施方案中,该单克隆抗体是抗CGRP拮抗剂抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体的量小于1000mg。在一些实施方案中,给该受试者施用小于3剂/月。在一些实施方案中,该施用是皮下或静脉内施用。在一些实施方案中,该单克隆抗体配制为至少150mg/mL的浓度。在一些实施方案中,其中该单克隆抗体以小于2mL的体积施用。在一些实施方案中,该受试者是人。在一些实施方案中,该单克隆抗体是人的或人源化的。在一些实施方案中,该单克隆抗体包括(a)具有如SEQ ID NO:3示出的CDR H1、如SEQ ID NO:4示出的CDR H2、如SEQ ID NO:5示出的CDR H3、如SEQ ID NO:6示出的CDR L1、如SEQ ID NO:7示出的CDR L2和如SEQ ID NO:8示出的CDR L3的抗体;或(b)如表6示出的根据(a)的抗体的变体。

[0071] 在一个方面,本发明提供用于减少受试者中抗头痛药的使用的组合物,其包括将调节CGRP途径的单克隆抗体(例如,抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者,其中该单克隆抗体的量能够有效减少受试者每月使用抗头痛药至少15%(例如20%、25%、30%、35%、40%或更多)。在一些实施方案中,该抗头痛药选自5-HT₁激动剂、曲坦、阿片制剂、 β -肾上腺素能拮

抗剂、麦角生物碱和非甾类抗炎药物 (NSAID)。在一些实施方案中,该抗头痛药是曲坦。在一些实施方案中,单克隆抗体的量小于1000mg。在一些实施方案中,给该受试者施用小于3剂/月。在一些实施方案中,该施用是皮下或静脉内施用。在一些实施方案中,该单克隆抗体配制为至少150mg/mL的浓度。在一些实施方案中,其中该单克隆抗体以小于2mL的体积施用。在一些实施方案中,该受试者是人。在一些实施方案中,该单克隆抗体是人的或人源化的。在一些实施方案中,该单克隆抗体包括 (a) 具有如SEQ ID NO:3示出的CDR H1、如SEQ ID NO:4示出的CDR H2、如SEQ ID NO:5示出的CDR H3、如SEQ ID NO:6示出的CDR L1、如SEQ ID NO:7示出的CDR L2和如SEQ ID NO:8示出的CDR L3的抗体;或 (b) 如表6示出的根据 (a) 的抗体的变体。

[0072] 在一个方面,本发明提供用于治疗或减少受试者中头痛(例如,偏头痛)的发作的组合物,其包括以调节CGRP途径的量将单剂的单克隆抗体(例如,单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者,其中该单克隆抗体的量介于100-2000mg之间。

[0073] 附图简述

[0074] 图1是示出12种鼠抗体对不同的丙氨酸取代的人 α -CGRP片段的结合亲和力的表格。结合亲和力在25°C下使用Biacore通过使Fab流经芯片上的CGRP来测量。框内数值表示丙氨酸突变体相对于亲本片段25-37(斜体)的亲合力丧失,但来源于19-37亲本的K35A除外。“^a”表示对于19-37和25-37片段的亲和力是在不同传感器芯片上的两个独立测定值的平均值 \pm 标准偏差。“^b”表示由于二相解离速率,这些相互作用与简单双分子相互作用模型有所偏差,因此使用构象变化模型测定它们的亲和力。灰度图例:白色(1.0)表示亲本亲和力;浅灰色(小于0.5)表示亲和力高于亲本;深灰色(大于2)表示亲和力低于亲本;以及黑色表示未检测到结合。

[0075] 图2A和2B示出了施用CGRP 8-37(400nmol/kg)、抗体4901(25mg/kg)和抗体7D11(25mg/kg)对皮肤血流量的影响,该皮肤血流量测量为电脉冲刺激30秒后的血细胞通量。在电脉冲刺激前3-5分钟静脉内施用(iv)CGRP 8-37。在电脉冲刺激前72小时腹膜内施用(IP)抗体。图中每个点表示在指定条件下处理的一只大鼠的AUC。图中每条线表示在指定条件下处理的大鼠的平均AUC。AUC(曲线下面积)等于 Δ 通量 \times Δ 时间。“ Δ 通量”表示电脉冲刺激后通量单位的变化;并且“ Δ 时间”表示血细胞通量水平恢复到电脉冲刺激前的水平所需时间段。

[0076] 图3示出了施用不同剂量的抗体4901(25mg/kg、5mg/kg、2.5mg/kg或1mg/kg)对皮肤血流量的影响,该皮肤血流量测量为电脉冲刺激30秒后的血细胞通量。在电脉冲刺激前24小时静脉内施用(IV)抗体。图中每个点表示在指定条件下处理的一只大鼠的AUC。图中的线表示在指定条件下处理的大鼠的平均AUC。

[0077] 图4A和4B示出了施用抗体4901(1mg/kg或10mg/kg,静脉内)、抗体7E9(10mg/kg,静脉内)和抗体8B6(10mg/kg,静脉内)对皮肤血流量的影响,该皮肤血流量测量为电脉冲刺激30秒后的血细胞通量。静脉内施用(i.v.)抗体,然后在抗体施用后30分钟、60分钟、90分钟和120分钟进行电脉冲刺激。Y轴表示与未施用抗体时(时间0)的AUC水平相比的AUC百分比。X轴表示抗体施用和电脉冲刺激之间的时间(分钟)段。与时间0相比,“*”表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$ 。使用单因素方差分析以及Dunnett多重比较检验分析数据。

[0078] 图5示出了抗体G1的重链可变区(SEQ ID NO:1)和轻链可变区(SEQ ID NO:2)的氨

氨基酸序列。Kabat CDR为粗体文本,Chothia CDR加下划线。重链和轻链可变区的氨基酸残基按顺序编号。

[0079] 图6示出了使用Biacore通过肽竞争绘制的抗体G1的表位图。N-生物素酰化人 α -CGRP被捕获在SA传感器芯片上。在不存在竞争肽或与10 μ M竞争肽预温育1h的情况下使G1 Fab (50nM) 流入芯片。测定芯片上G1 Fab与人 α -CGRP的结合。Y轴表示与不存在竞争肽时的结合相比,竞争肽存在时阻断的结合的百分比。

[0080] 图7示出了施用抗体G1 (1mg/kg或10mg/kg, 静脉内) 或媒介物 (PBS, 0.01% Tween 20) 对皮肤血流量的影响, 该皮肤血流量测量为电脉冲刺激30秒后的血细胞通量。静脉内施用 (i.v.) 抗体G1或媒介物, 然后在抗体施用后30分钟、60分钟、90分钟和120分钟进行神经电脉冲刺激。Y轴表示与未施用抗体或媒介物 (定义为100%) 时 (时间0) 的AUC水平相比的AUC百分比。X轴表示抗体施用和电脉冲刺激之间的时间 (分钟) 段。与媒介物相比, “*”表示 $P < 0.05$, “**”表示 $P < 0.01$ 。使用双因素方差分析和Bonferroni事后检验分析数据。

[0081] 图8A示出了施用抗体G1 (1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg, 静脉内) 或媒介物 (PBS, 0.01% Tween 20) 对皮肤血流量的影响, 该皮肤血流量测量为给药后24小时电脉冲刺激30秒后的血细胞通量。在神经电脉冲刺激前24小时静脉内施用 (i.v.) 抗体G1或媒介物。Y轴表示总曲线下面积 (血细胞通量的变化乘以从刺激直到通量恢复到基线的时间变化, AUC)。X轴表示不同剂量的抗体G1。与媒介物相比, “*”表示 $P < 0.05$, “**”表示 $P < 0.01$ 。使用单因素方差分析和Dunn多重比较检验分析数据。

[0082] 图8B示出了施用抗体G1 (0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg, 静脉内) 或媒介物 (PBS, 0.01% Tween 20) 对皮肤血流量的影响, 该皮肤血流量测量为给药后7天电脉冲刺激30秒后的血细胞通量。在神经电脉冲刺激前7天静脉内施用 (i.v.) 抗体G1或媒介物。Y轴表示总AUC。X轴表示不同剂量的抗体G1。与媒介物相比, “**”表示 $P < 0.01$, “***”表示 $P < 0.001$ 。使用单因素方差分析和Dunn多重比较检验分析数据。

[0083] 图8C是图8A和8B的数据的曲线拟合分析。在神经电脉冲刺激前24小时或7天静脉内施用 (i.v.) 抗体G1或媒介物。Y轴表示总AUC。X轴表示不同剂量的抗体G1, 对数标度以“mg/kg”表示, 以确定 EC_{50} 。

[0084] 图9示出了在电场刺激后抗体mu7E9 (10mg/kg)、BIBN4096BS或媒介物 (PBS, 0.01% Tween 20) 对中脑膜动脉直径变化的影响。在响应于电刺激的基线建立后, 在时间点0分钟静脉内施用 (i.v.) 抗体mu7E9、BIBN4096BS或媒介物。Y轴表示电场刺激后中脑膜动脉的直径的变化。静止直径对应于0%。X轴表示电脉冲刺激的时间 (分钟)。与媒介物相比, “*”表示 $P < 0.05$, “**”表示 $P < 0.01$ 。使用单因素方差分析和Dunnett多重比较检验分析数据。

[0085] 图10示出了在电场刺激后不同剂量的抗体G1 (1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg, 静脉内) 或媒介物 (PBS, 0.01% Tween 20) 对中脑膜动脉直径变化的影响。在电场刺激前7天静脉内施用 (i.v.) 抗体G1或媒介物。Y轴表示中脑膜动脉的直径变化。静止直径对应于0%。X轴表示刺激电压。与媒介物相比, “*”表示 $P < 0.05$, “**”表示 $P < 0.01$, “***”表示 $P < 0.001$ 。使用双因素方差分析和Bonferroni事后检验分析数据。

[0086] 图11A示出了给吗啡成瘾大鼠皮下注射纳洛酮 (1mg/kg) 前24小时静脉内施用 (i.v.) 抗体mu4901 (10mg/kg) 或媒介物 (PBS, 0.01% Tween 20) 对所述皮下注射诱导的体核温度降低的影响。Y轴表示温度与基线的差值。X轴表示从纳洛酮注射点开始测量的时间。

[0087] 图11B示出了给吗啡成瘾大鼠皮下注射纳洛酮(1mg/kg)前24小时静脉内施用(i.v.)抗体mu4901(10mg/kg)或媒介物(PBS,0.01%Tween 20)对所述皮下注射诱导的尾表温度升高的影响。Y轴表示温度与基线的差值。X轴表示从纳洛酮注射点开始测量的时间。

[0088] 图12是示出比较不同剂量的抗体G1与安慰剂的效应的临床研究的结果图。

[0089] 图13是示出比较不同剂量的抗体G1与安慰剂的效应的临床研究的结果图。

[0090] 图14是示出比较不同剂量的抗体G1与安慰剂的效应的临床研究的结果图。

[0091] 图15是示出比较不同剂量的抗体G1与安慰剂的效应的临床研究的结果图。

[0092] 图16是示出比较不同剂量的抗体G1与安慰剂的效应的临床研究的结果图。

[0093] 图17是示出比较不同剂量的抗体G1与安慰剂的效应的临床研究的结果图。

[0094] 图18是示出比较不同剂量的抗体G1与安慰剂的效应的临床研究的结果图。

具体实施方式

[0095] 在一些方面,本文所公开的发明提供用于治疗 and/或预防个体中血管舒缩症状(例如,热潮红)的方法,所述治疗和/或预防通过将治疗有效量的抗CGRP拮抗剂抗体施用于个体来进行。

[0096] 在一些方面,本文所公开的发明提供用于在个体中治疗和/或预防头痛(例如,偏头痛、丛集性头痛、慢性头痛和紧张性头痛)的方法,所述治疗和/或预防通过将治疗有效量的抗CGRP拮抗剂抗体施用于个体来进行。在一些情况下,该头痛是偏头痛。

[0097] 在一些方面,本文所公开的发明还提供来源于表6示出的G1或其变体的抗CGRP拮抗剂抗体和多肽。在一些实施方案中,本发明还提供制备和使用这些抗体和多肽的方法。

[0098] 在本申请通篇中,引用各种出版物(包括专利和专利申请)。这些出版物的公开内容全文据此以引用方式并入。

[0099] 一般技术

[0100] 除非另外指明,本发明的各方面的实践将利用分子生物学(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,这些技术在本领域技术的范围内。此类技术已在文献中充分解释,所述文献诸如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等,1989)Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait编,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编,1998)Academic Press;Animal Cell Culture (R.I.Freshney编,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编,1993-1998)J.Wiley and Sons;Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等编,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction(Mullis等编,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等编,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.编,IRL Press,1988-1989);

Monoclonal antibodies:a practical approach (P.Shepherd和C.Dean编,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编,Harwood Academic Publishers,1995)。

[0101] 定义

[0102] “抗体”是能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区的至少一个抗原识别位点特异性结合靶标(诸如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)的免疫球蛋白分子。如本文所用,该术语不仅涵盖完整的多克隆或单克隆抗体,而且涵盖其片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、突变体、包含抗体部分的融合蛋白(诸如结构域抗体)和包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其它经修饰的构型。抗体包括任何类别的抗体,诸如IgG、IgA或IgM(或它们的子类别),并且抗体不一定是任何特定类别。可根据抗体重链的恒定结构域的抗体氨基酸序列,将免疫球蛋白分为不同的类别。免疫球蛋白有五种主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类别中的一些可进一步分为子类别(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。

[0103] 如本文所用,“单克隆抗体”是指从基本上均质的抗体群体获得的抗体,即除可少量存在的可能的天然存在的突变之外,组成所述群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体具有高度特异性,该抗体针对单个抗原性位点。此外,与多克隆抗体制剂(其通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体)相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”表示抗体的特性是从基本上均质的抗体群体获得,并且不应理解为要求通过任何特定方法生成抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可通过Kohler和Milstein,1975, Nature, 256:495首先描述的杂交瘤法制备,或可通过诸如美国专利No.4,816,567所述的重组DNA法制备。该单克隆抗体也可从噬菌体文库分离,该噬菌体文库使用例如McCafferty等,1990, Nature, 348:552-554所述的技术生成。

[0104] 如本文所用,“人源化”抗体是指这样的非人(例如,鼠)抗体形式:其为特异性嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其包含来源于非人免疫球蛋白的最小序列的片段(诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原结合子序列)。在大多数情况下,人源化抗体是这样的人免疫球蛋白(受者(recipient)抗体):其中受者的互补性决定区(CDR)的残基被具有所需特异性、亲和力和生物活性的非人物种CDR(供体抗体)的残基置换,该非人物种诸如小鼠、大鼠或兔。在某些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被对应的非人残基置换。此外,人源化抗体可包含这样的残基:该残基既不存在于受者抗体中也不存在于引入的CDR或框架序列中,但包括这些残基在内以进一步精炼和优化抗体性能。一般来讲,人源化抗体将包含基本上所有(至少一个,通常两个)可变结构域,其中所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些CDR区,并且所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些FR区。人源化抗体最佳地还将包含免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc),通常人免疫球蛋白的恒定区或结构域的至少一部分。抗体可具有如WO 99/58572所述修饰的Fc区。人源化抗体的其它形式具有一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个、六个),这些CDR相对于原始抗体有所改变,也称为“来源于”原始抗体的一个或多个CDR的一个或多个CDR。

[0105] 如本文所用,“人抗体”意指具有对应于由人产生和/或使用本领域已知或本文所

公开的制备人抗体的任何技术制备的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体的此定义包括包含至少一个人重链多肽或至少一个人轻链多肽的抗体。一个此类实例是包含鼠轻链和人重链多肽的抗体。人抗体可使用本领域已知的各种技术制备。在一个实施方案中,该人抗体选自噬菌体文库,其中该噬菌体文库表达人抗体 (Vaughan等,1996,Nature Biotechnology,14:309-314;Sheets等,1998,PNAS, (USA) 95:6157-6162;Hoogenboom和Winter,1991,J.Mol.Biol.,227:381;Marks等,1991,J.Mol.Biol.,222:581)。人抗体也可通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物 (例如,其中内源性免疫球蛋白基因已部分或完全失活的小鼠) 来制备。此方法在美国专利No.5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425和5,661,016中有所描述。或者,该人抗体可通过使产生针对靶抗原的抗体的人B淋巴细胞永生来制备 (此类B淋巴细胞可从个体回收,或可在体外被免疫)。参见例如Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77 (1985); Boerner等, 1991, J. Immunol., 147 (1): 86-95; 以及美国专利No.5,750,373。

[0106] 如本文所用,术语“降钙素基因相关肽”和“CGRP”是指保持CGRP的至少部分活性的任何形式的降钙素基因相关肽及其变体。例如,CGRP可以是 α -CGRP或 β -CGRP。如本文所用,CGRP包括所有哺乳动物物种 (例如,人、犬、猫、马和牛) 的天然序列CGRP。

[0107] 如本文所用,“抗CGRP拮抗剂抗体” (可互换地称为“抗CGRP抗体”) 是指能够结合CGRP并且抑制CGRP生物活性和/或CGRP信号转导介导的下游途径的抗体。抗CGRP拮抗剂抗体涵盖这样的抗体,该抗体调节、阻断、拮抗、抑制或减少 (包括显著) CGRP生物活性,或者拮抗CGRP途径,包括CGRP信号转导介导的下游途径,诸如受体结合和/或对CGRP的细胞应答的引发。就本发明的目的而言,应明确理解:术语“抗CGRP拮抗剂抗体”涵盖所有此前定义的术语、题目以及功能状态和特征,据此CGRP本身、CGRP生物活性 (包括但不限于其介导任何方面的头痛的能力) 或生物活性的结果在任何有意义的程度上被基本上消除、减少或中和。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体结合CGRP,并且防止CGRP结合到CGRP受体。在其它实施方案中,抗CGRP抗体结合CGRP,并且防止CGRP受体的活化。本文提供了抗CGRP拮抗剂抗体的实例。

[0108] 如本文所用,术语“G1”和“抗体G1”可互换使用,是指通过具有保藏号ATCC PTA-6867和ATCC PTA-6866的表达载体制备的抗体。重链和轻链可变区的氨基酸序列如图5所示。抗体G1的CDR部分 (包括Chothia和Kabat CDR) 图示于图5中。编码重链和轻链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示。G1的表征如实施例所述。

[0109] 术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是指任何长度的氨基酸聚合物。该聚合物可以是直链的或支链的,它可包含经修饰的氨基酸,并且该氨基酸可被非氨基酸打断。该术语还涵盖经天然或通过介入修饰的氨基酸聚合物;该修饰例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操纵或修饰,诸如与标记组分缀合。还包括在该定义中的是例如包含一个或多个氨基酸类似物 (包括例如非天然氨基酸等) 以及本领域已知的其它修饰的多肽。应当理解,因为本发明的多肽是基于抗体的,所以该多肽可以单链或相关的链存在。

[0110] “多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换使用,是指任何长度的核苷酸聚合物,且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基和/或它们的类似物,或可通过DNA或RNA聚合酶合并为聚合物的任何底物。多核苷酸可包含经修饰

的核苷酸,诸如经甲基化核苷酸和它们的类似物。如果存在,核苷酸结构的修饰可在聚合物组装之前或之后实施。核苷酸的序列可被非核苷酸组分打断。多核苷酸可在聚合后进一步修饰,诸如通过与标记组分缀合。其它类型的修饰包括例如“帽”、用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰以及未经修饰形式的多核苷酸,该核苷酸间修饰诸如例如具有不带电的键(例如,甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酸酰胺、氨基甲酸酯等)和具有带电的键(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些修饰、包含侧基部分诸如例如蛋白质(例如,核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等)的那些修饰、具有嵌入剂(例如,吡啶、补骨脂素等)的那些修饰、包含螯合剂(例如,金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)的那些修饰、包含烷基化剂的那些修饰、具有经修饰的键联的那些修饰(例如, α -异头核酸等)。另外,通常存在于糖中的任何羟基可以例如被标准保护基团保护的磷酸酯基团、磷酸酯基团取代,或活化以制备连接到另外的核苷酸的另外的键,或可缀合到固相载体。 $5'$ 和 $3'$ 末端OH可以是磷酸化的,或被胺或具有1至20个碳原子的有机加帽基团部分取代。其它羟基也可衍生化为标准保护基团。多核苷酸也可包含通常本领域已知的类似形式的核糖或脱氧核糖,包括例如 $2'$ -O-甲基核糖、 $2'$ -O-烯丙基核糖、 $2'$ -氟核糖或 $2'$ -叠氮核糖、碳环糖类似物、 α -异头糖、差向异构糖诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和无碱基核苷类似物诸如甲基核糖核苷。一个或多个磷酸二酯键可被替代连接基团替换。这些替代连接基团包括但不限于其中磷酸酯被P(O)S(“硫代磷酸酯”)、P(S)S(“二硫代磷酸酯”)、(O)NR₂(“酰胺”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“甲缩醛”)替换的实施方案,其中每个R或R'独立地为H或任选地包含(-O-)键、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)的取代的或未取代的烷基(1-20个碳)。多核苷酸中的所有键不一定是相同的。上文描述适用于本文涉及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0111] 抗体的“可变区”是指单独或组合的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区。重链和轻链的可变区各自由四个框架区(FR)构成,该框架区通过三个互补性决定区(CDR)也称为高变区连接。每条链的CDR通过FR紧密保持在一起,其中另一条链的CDR有助于形成抗体的抗原结合位点。存在至少两种确定CDR的技术:(1)基于跨物种序列变异性的方法(即,Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest(第5版,1991,National Institutes of Health,Bethesda MD));以及(2)基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(Al-lazikani等,(1997)J.Molec.Biol.273:927-948))。如本文所用,CDR可以指任何一种方法或两种方法的组合定义的CDR。

[0112] 抗体的“恒定区”是指单独或组合的抗体轻链的恒定区或抗体重链的恒定区。

[0113] “优先结合”或“特异性结合”(在本文中可互换使用)抗体或多肽的表位是本领域熟知的术语,并且确定此类特异性或优先结合的方法也是本领域熟知的。如果分子与特定细胞或物质的反应或结合比替代细胞或物质更频繁、更迅速、具有更长的持续时间和/或具有更高的亲和力,则将该分子称为表现出“特异性结合”或“优先结合”。如果抗体与靶标的结合比其它物质具有更高的亲和力、亲合力、更容易和/或具有更长的持续时间,则该抗体“特异性结合”或“优先结合”靶标。例如,特异性或优先结合CGRP表位的抗体是结合该表位比结合其它CGRP表位或非CGRP表位具有更高的亲和力、亲合力、更容易和/或具有更长的持续时间的抗体。通过阅读该定义还应当理解,例如特异性或优先结合第一靶标的抗体(或部分或表位)可以或不可以特异性或优先结合第二靶标。因此,“特异性结合”或“优先结合”不

一定需要(虽然可包括)排他性结合。一般来讲,但不一定如此,所涉及的结合意指优先结合。

[0114] 如本文所用,“基本上纯的”是指纯度为至少50%(即,不含污染物)、更优选地纯度为至少90%、更优选地纯度为至少95%、更优选地纯度为至少98%、更优选地纯度为至少99%的材料。

[0115] “宿主细胞”包括可以是或已经是载体的受者的单个细胞或细胞培养物,该载体用于掺入多核苷酸插入序列。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代,由于天然、意外或故意突变,该子代不一定与原始母细胞完全相同(在形态或基因组DNA互补序列方面)。宿主细胞包括用本发明的多核苷酸体内转染的细胞。

[0116] 术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区。“Fc区”可以是天然序列Fc区或变体Fc区。虽然免疫球蛋白重链的Fc区的边界可变化,但是人IgG重链Fc区通常定义为从氨基酸残基位置Cys226或从Pro230至其羧基末端的一段。Fc区中残基的编号是Kabat中EU索引的编号。Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991。免疫球蛋白的Fc区通常包含两个恒定结构域CH2和CH3。

[0117] 如本文所用,“Fc受体(receptor)”和“FcR”描述了结合抗体的Fc区的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体(γ 受体)的FcR,并且包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII子类别的受体,包括等位基因变体或者这些受体的可变剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),它们具有类似的氨基酸序列,该序列的差异主要在于它们的细胞质结构域。FcR在Ravetch和Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel等, 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; 和de Haas等, 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41中有所综述。“FcR”还包括新生儿受体FcRn, 该受体负责母体IgG至胎儿的转移(Guyer等, 1976, *J. Immunol.*, 117:587; 和Kim等, 1994, *J. Immunol.*, 24:249)。

[0118] “补体依赖性细胞毒性”和“CDC”是指在存在补体的情况下靶标的裂解。补体活化途径由补体系统的第一组分(C1q)与分子(例如,抗体)的结合引发,该分子与同源抗原复合。为评估补体活化,可进行例如Gazzano-Santoro等, *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996)所述的CDC测定。

[0119] “功能Fc区”具有天然序列Fc区的至少一个效应功能。示例性“效应功能”包括C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体(例如B细胞受体、BCR)的下调等。此类效应作用通常需要Fc区与结合结构域(例如,抗体可变结构域)组合,并且可使用本领域已知的用于评估此类抗体效应功能的各种测定来评估。

[0120] “天然序列Fc区”包含与天然存在的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。“变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰而不同于天然序列Fc区,但保持天然序列Fc区的至少一种效应功能的氨基酸序列。优选地,与天然序列Fc区或与亲本多肽的Fc区相比,该变体Fc区具有至少一个氨基酸取代,例如天然序列Fc区中或亲本多肽的Fc区中的约一个至约十个氨基酸取代,并且优选地约一个至约五个氨基酸取代。变体Fc区在本文中优选地与天然序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%序列相同性,最优选地与它们具有至少约

90%序列相同性,更优选地与它们具有至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%序列相同性。

[0121] 如本文所用,“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体,并随后引起靶细胞裂解。所关注的分子的ADCC活性可使用诸如美国专利No.5,500,362或5,821,337中所述的体外ADCC测定来评估。可用于此类测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和NK细胞。作为另外一种选择或除此之外,所关注的分子的ADCC活性可在体内例如在动物模型中评估,诸如Clynes等,1998,PNAS(USA), 95:652-656中所公开的动物模型。

[0122] 如本文所用,“治疗”是用于获得有益的或所期望的临床结果的方法。就本发明的目的而言,有益的或所期望的临床结果包括但不限于以下结果中的一者或多者:在头痛的任何方面的改善,包括减轻严重性、缓和疼痛强度和其它相关症状、减少复发频率、提高患有头痛的患者的生活质量以及减少治疗头痛所需的其它药物的剂量。对于偏头痛,其它相关症状包括但不限于恶心、呕吐以及对光、声音和/或运动敏感。对于丛集性头痛,其它相关症状包括但不限于眼下或周围肿胀、多泪、红眼、鼻液溢或鼻充血和面潮红。

[0123] “减少”头痛的“发作”意指减轻严重性(可包括减少通常用于该病症的其它药物和/或治疗的需要和/或量(例如,暴露),所述其它药物包括例如用于偏头痛的麦角胺、二氢麦角胺或曲坦)、持续时间和/或频率(包括例如在个体中延迟或增加下一次偶然发作的时间)中的任一者。如本领域的技术人员所理解,个体可在它们对治疗的反应方面不同,同样,例如,“减少个体中头痛的发作的方法”反映了在合理期望(此类施用很可能在该特定个体中引起此类发作的减少)的基础上施用抗CGRP拮抗剂抗体。

[0124] “改善”头痛或头痛的一种或多种症状意指与未施用抗CGRP拮抗剂抗体相比,减轻或改善头痛的一种或多种症状。“改善”还包括缩短或减少症状的持续时间。

[0125] 如本文所用,“控制头痛”是指在个体中保持或减少头痛的一种或多种症状的严重性或持续时间或头痛发作的频率(与治疗前的水平相比)。例如,与治疗前的水平相比,减少个体中头痛的持续时间或严重性或发作频率至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%或70%中的任一者。

[0126] 如本文所用,“头痛小时”是指受试者经历头痛期间的小时数。头痛小时可以整小时(例如,一个头痛小时、两个头痛小时、三个头痛小时等)或以整小时和部分小时(例如,0.5个头痛小时、1.2个头痛小时、2.67个头痛小时等)表示。一个或多个头痛小时可以就特定时间间隔进行描述。例如,“每天头痛小时”可以指受试者在一天间隔(例如,24小时时期)内经历的头痛小时数。在另一个实例中,“每周头痛小时”可以指受试者在一周间隔(例如,7天时期)内经历的头痛小时数。可以理解,一周间隔可以或可以不对应于日历周。在另一个实例中,“每月头痛小时数”可以指受试者在一个月间隔内经历的头痛小时数。可以理解,一个月间隔(例如,28-31天时期)就天数而言可以根据特定的月份而变化,并且可以或可以不对应于日历月。在又一个实例中,“每年头痛小时”可以指受试者在一年间隔内经历的头痛小时数。可以理解,一年间隔(例如,365天或366天时期)就天数而言可以根据特定的年份而变化,并且可以或可以不对应于日历年。在一些实施方案中,头痛小时可结合特定类型的头痛(例如,偏头痛、丛集性头痛、慢性头痛和紧张性头痛)。例如“偏头痛小时”可以指期间受

试者经历偏头痛期间的小时数。

[0127] 如本文所用,“头痛天”是指受试者经历头痛期间的天数。头痛天可以整天(例如,一个头痛天、两个头痛天、三个头痛天等)或以整天和部分天(例如,0.5个头痛天、1.2个头痛天、2.67个头痛天等)表示。一个或多个头痛天可以就特定时间间隔进行描述。例如,“每周头痛天”可以指受试者在一周间隔(例如,7天时期)内经历的头痛天数。可以理解,一周间隔可以或可以不对应于日历周。在另一个实例中,“每月头痛天”可以指受试者在一个月间隔内经历的头痛天数。可以理解,一个月间隔(例如,28-31天时期)就天数而言可以根据特定的月份而变化,并且可以或可以不对应于日历月。在又一个实例中,“每年头痛天”可以指受试者在一年间隔内经历的头痛天数。可以理解,一年间隔(例如,365天或366天时期)就天数而言可以根据特定的年份而变化,并且可以或可以不对应于日历年。在一些实施方案中,头痛天可结合特定类型的头痛(例如,偏头痛、丛集性头痛、慢性头痛和紧张性头痛)。例如“偏头痛天”可以指受试者经历偏头痛期间的天数。

[0128] 如本文所用,“延迟”头痛的发展意指延缓、妨碍、减缓、阻止、稳定和/或推迟疾病的进展。根据病史和/或待治疗的个体,该延迟可具有不同的时间长度。如本领域的技术人员所显而易见,充分或显著的延迟实际上可涵盖预防,因为个体不会患上头痛(例如,偏头痛)。“延迟”症状发展的方法是,与未使用该方法相比,在给定时间范围内降低症状发展的概率和/或在给定时间范围内减少症状的程度的方法。此类比较通常基于临床研究,该临床研究使用数量具有统计学上的显著性的受试者进行。

[0129] 头痛的“发展”或“进展”意指病状的最初表现和/或随后进展。头痛的发展可使用本领域熟知的标准临床技术检测和评估。然而,发展还指不可检测的进展。就本公开的目的而言,发展或进展是指症状的生物学过程。“发展”包括发生、复发和发病。如本文所用,头痛的“发病”或“发生”包括初发和/或复发。

[0130] 如本文所用,药物、化合物或药物组合物的“有效剂量”或“有效量”是足以实现有益的或所期望的结果的量。对于预防性用途,有益的或所期望的结果包括诸如消除或降低风险、减轻严重性或延迟疾病发病的结果,包括疾病的生物化学、组织学和/或行为症状,其并发症和疾病发展期间存在的中间病理学表型。对于治疗性用途,有益的或所期望的结果包括以下临床结果:诸如减少疼痛强度、持续时间或头痛发作的频率,以及减少头痛引起的一种或多种症状(生物化学、组织学和/或行为),包括其并发症和疾病发展期间存在的中间病理学表型,提高患有疾病的患者的生活质量,减少治疗疾病所需的其它药物的剂量,增强另一种药物的效果,和/或延迟患者疾病的进展。有效剂量可一次或多次施用。就本公开的目的而言,药物、化合物或药物组合物的有效剂量是足以直接或间接实现预防性或治疗性治疗的量。如在临床情形中所理解,药物、化合物或药物组合物的有效剂量可以或可以不与另一种药物、化合物或药物组合物联合实现。因此,“有效剂量”可在施用一种或多种治疗剂的情形中考虑,并且如果与一种或多种其它药剂联合,可实现或已实现所期望的结果,则考虑以有效量给予单个药剂。

[0131] “个体”或“受试者”是哺乳动物,更优选地人。哺乳动物还包括但不限于家畜、运动动物、宠物、灵长类、马、狗、猫、小鼠和大鼠。

[0132] 如本文所用,“载体”意指能够在宿主细胞中递送,优选地表达一个或多个所关注的基因或序列的构建体。载体的实例包括但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、

粘粒或噬菌体载体、与阳离子凝聚剂相关的DNA或RNA表达载体、包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体以及某些真核细胞诸如生产细胞。

[0133] 如本文所用,“表达控制序列”意指指导核酸的转录的核酸序列。表达控制序列可以是启动子,诸如组成型或诱导型启动子,或增强子。表达控制序列可操作地连接至待转录的核酸序列。

[0134] 如本文所用,“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”包括当与活性成分组合时,允许该成分保持生物活性,并且对受试者的免疫系统无反应性的任何材料。实例包括但不限于任何标准药用载体,诸如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液诸如油/水乳液以及各种类型的润湿剂。气雾剂或肠道外施用的优选稀释剂是磷酸盐缓冲盐水或生理(0.9%)盐水。包含此类载体的组合物通过熟知的常规方法配制(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,A.Gennaro编,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1990;和Remington,The Science and Practice of Pharmacy,第20版,Mack Publishing,2000)。

[0135] 如本文所用,术语“ k_{on} ”旨在指抗体与抗原结合的速率常数。

[0136] 如本文所用,术语“ k_{off} ”旨在指抗体从抗体/抗原复合物解离的速率常数。

[0137] 如本文所用,术语“ K_D ”旨在指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0138] 如本文所用,术语“血管舒缩症状”旨在指与血管舒张相关的情况。此类血管舒张可与以下症状相关或可能相关:头痛(诸如有前兆或无前兆的偏头痛;偏瘫偏头痛;慢性偏头痛;偶发性偏头痛;高频偶发性偏头痛;丛集性头痛;偏头痛性神经痛;慢性头痛;紧张性头痛;其它医学病症(诸如由肿瘤引起的感染或颅内压升高)导致的头痛;慢性阵发性偏头痛;与结构性损害无关的其它头痛;与非血管性颅内疾病相关的头痛;与物质施用或其撤销相关的头痛;与非头部感染相关的头痛;与代谢紊乱相关的头痛;与头盖、颈部、眼、耳、鼻、窦、牙齿、口或其它面部或头盖结构疾病相关的头痛;颅部神经痛;以及神经干疼痛和传入神经阻滞疼痛)、特别是体温调节机能障碍导致的热潮红(或潮热)、潮冷、不眠症、睡眠障碍、情绪障碍、易怒、汗脱、盗汗、日间排汗、疲劳等等。

[0139] 如本文所用,术语“潮红”、“热潮红”和“潮热”是本领域认可的术语,是指体温的偶发性波动,通常由突发性皮肤潮红组成,通常伴随着受试者的排汗。

[0140] A. 预防或治疗血管舒缩症状和/或头痛的方法

[0141] 在一个方面,本发明提供治疗或减少受试者中至少一种血管舒缩症状的发作的方法。在另一个方面,本发明提供治疗或减少受试者中头痛(例如,偏头痛)的发作的方法。在一些实施方案中,该方法包括将有效量的来源于调节CGRP途径的抗体(例如,单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)的抗体或多肽施用于个体。在一些实施方案中,该至少一种血管舒缩症状可与头痛(例如,偏头痛)和/或热潮红相关。

[0142] 在另一个方面,本发明提供用于改善、控制、减少个体中至少一种血管舒缩症状的发作或延迟该症状的发展或进展的方法,其包括将有效量的抗CGRP拮抗剂抗体施用于个体。在一些实施方案中,该至少一种血管舒缩症状可与头痛(例如,偏头痛)和/或热潮红相关。

[0143] 在另一个方面,本发明提供用于改善、控制、减少个体中头痛(例如,偏头痛)或头痛相关的症状(例如,痢疾或光敏性)的发作或延迟头痛或头痛相关的症状的发展或进展的

方法,其包括将有效量的调节CGRP途径的抗体或抗CGRP拮抗剂抗体与至少一种用于治疗头痛的另外的药剂组合施用于个体。

[0144] 此类另外的药剂包括但不限于5-HT激动剂和NSAID。例如,该抗体和至少一种另外的药剂可合并施用,即它们的给药在时间上足够接近,以允许它们的单独治疗效果重叠。例如,与施用这些试剂中的任一种而缺乏另一种的情况下相比,与抗CGRP抗体组合施用的5-HT激动剂或NSAID的量应足以减少患者中头痛复发的频率或产生更持久的功效。该程序可用于治疗头痛,所述头痛属于包括以下的广泛类别:有前兆或无前兆的偏头痛;偏瘫偏头痛;慢性偏头痛;偶发性偏头痛;高频偶发性偏头痛;丛集性头痛;偏头痛性神经痛;慢性头痛;紧张性头痛;其它医学病症导致的头痛(诸如由肿瘤引起的感染或颅内压升高);慢性阵发性偏头痛;与结构性损害无关的其它头痛;与非血管性颅内疾病相关的头痛;与物质施用或其撤销相关的头痛;与非头部感染相关的头痛;与代谢紊乱相关的头痛;与头盖、颈部、眼、耳、鼻、窦、牙齿、口或其它面部或头盖结构疾病相关的头痛;颅部神经痛;以及神经干疼痛和传入神经阻滞疼痛。

[0145] 可与抗CGRP拮抗剂抗体组合施用的另外的药剂的另外非限制性实例包括以下药剂中的一者或多者:

[0146] (i) 阿片样物质止痛药,例如,吗啡、海洛因、氢吗啡酮、氧吗啡酮、羟甲左吗喃、烯丙左吗喃、美沙酮、哌替啶、芬太尼、可卡因、可待因、二氢可待因、氧可酮、氢可酮、丙氧芬、纳美芬、纳洛芬、纳洛酮、纳曲酮、丁丙诺啡、布托啡诺、纳布啡或喷他佐辛;

[0147] (ii) 非甾体抗炎药(NSAID),例如,阿司匹林、双氯芬酸、二氟尼柳、依托度酸、芬布芬、非诺洛芬、氟苯柳、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、酮咯酸、甲氯芬那酸、甲芬那酸、萘丁美酮、萘普生、噁丙嗪、苯基丁氮酮、吡罗昔康、舒林酸、托美丁或佐美酸、环加氧酶-2(COX-2)抑制剂、塞来昔布;罗非昔布;美洛昔康;JTE-522;L-745,337;NS398;或它们的药学上可接受的盐;

[0148] (iii) 巴比妥类镇静剂,例如,异戊巴比妥、阿普比妥、仲丁巴比妥、布他比妥、甲苯巴比妥、美沙比妥、美索比妥、戊巴比妥、苯巴比妥、司可巴比妥、他布酮、塞麦妥(theamylal)或戊硫代巴比妥或它们的药学上可接受的盐;

[0149] (iv) 巴比妥类止痛药,例如,布他比妥或它们的药学上可接受的盐或包含布他比妥的组合物。

[0150] (v) 具有镇静剂作用的苯二氮卓类,例如,甲氨二氮卓、氯氮卓、地西泮、氟西泮、劳拉西泮、奥沙西泮、替马西泮或三唑仑或它们的药学上可接受的盐;

[0151] (vi) 具有镇静剂作用的H₁拮抗剂,例如,苯海拉明、吡拉明、普鲁米近、氯苯那敏或氯环嗪或它们的药学上可接受的盐;

[0152] (vii) 镇静剂,诸如格鲁米特、安宁(meprobamate)、甲喹酮或二氯醛比林或它们的药学上可接受的盐;

[0153] (viii) 骨骼肌松弛药,例如,巴氯芬、卡立普多、氯唑沙宗、环苯扎林、美索巴莫或邻甲苯海拉明或它们的药学上可接受的盐;

[0154] (ix) NMDA受体拮抗剂,例如,右美沙芬((+)-3-羟基-N-甲基吗啡喃)或其代谢物右啡烷((+)-3-羟基-N-甲基吗啡喃)、开他敏、美金刚、吡咯并喹啉酮或顺式-4-(磷酸基甲基)-2-哌啶羧酸或它们的药学上可接受的盐;

- [0155] (x) α -肾上腺素能药物,例如,多沙唑嗪、坦索罗辛、可乐定或4-氨基-6,7-二甲氧基-2-(5-甲烷磺酰胺基-1,2,3,4-四氢异喹啉-2-基)-5-(2-吡啶基)喹啉;
- [0156] (xi) 三环抗抑郁药,例如,地昔帕明、米帕明、阿米替林或去甲替林;
- [0157] (xii) 抗惊厥剂,例如,卡马西平或丙戊酸;
- [0158] (xiii) 速激肽(NK)拮抗剂,特别是NK-3、NK-2或NK-1拮抗剂,例如(α R,9R)-7-[3,5-双(三氟甲基)苄基]-8,9,10,11-四氢-9-甲基-5-(4-甲基苯基)-7H-[1,4]二氮杂卓[2,1-g][1,7]萘啶-6-13-二酮(TAK-637)、5-[[(2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙氧基-3-(4-氟苯基)-4-吗啉基]甲基]-1,2-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮(MK-869)、拉奈匹坦、达匹坦或3-[[2-甲氧基-5-(三氟甲氧基)苯基]甲基氨基]-2-苯基-哌啶(2S,3S);
- [0159] (xiv) 毒蕈碱拮抗剂,例如,奥昔布宁、托特罗定、丙哌维林、曲司氯铵或达非那新;
- [0160] (xv) COX-2抑制剂,例如,塞来昔布、罗非昔布或伐地考昔;
- [0161] (xvi) 非选择性COX抑制剂(优选地具有GI保护),例如,硝基氟吡洛芬(HCT-1026);
- [0162] (xvii) 煤焦油止痛药,特别是对乙酰氨基酚;
- [0163] (xviii) 安定药,诸如达哌啶醇;
- [0164] (xix) 香草素受体激动剂(例如,树脂毒素)或拮抗剂(例如,辣椒平);
- [0165] (xix) β -肾上腺素能药物,诸如普萘洛尔;
- [0166] (xx) 局部麻醉剂,诸如美西律;
- [0167] (xxi) 皮质类固醇,诸如地塞米松;
- [0168] (xxii) 5-羟色胺受体激动剂或拮抗剂;
- [0169] (xxiii) 胆碱能(烟碱型)止痛药;
- [0170] (xxiv) 反胺苯环醇(Tramadol)(商标);
- [0171] (xxv) PDEV抑制剂,诸如西地那非、伐地那非或他达拉非;
- [0172] (xxvi) α -2- δ 配体,诸如加巴喷丁或普加巴林;
- [0173] (xxvii) 大麻素(cannabinoid);以及
- [0174] (xxviii) 抗抑郁药,诸如阿米替林(Elavil)、曲唑酮(Desyrel)和丙咪嗪(Tofranil)或抗惊厥剂,诸如苯妥英(Dilantin)或卡马西平(Tegretol)。
- [0175] 本领域的技术人员将能够确定与抗CGRP抗体组合使用的特定药剂的适当剂量。例如,舒马曲坦可以约0.01至约300mg的剂量施用。在一些情况下,舒马曲坦可以2mg至300mg的剂量施用。当非肠道外施用时,舒马曲坦的典型剂量为约25至约100mg,约50mg是通常优选的,并且当肠道外施用时,优选的剂量是约6mg。然而,这些剂量可根据本领域的标准方法而变化,以使得它们可为特定的患者或为特定的组合治疗而优化。另外,例如,塞来昔布可以介于50和500mg之间的量施用。
- [0176] 在另一个方面,本发明提供用于改善、控制、减少个体中热潮红的发作或延迟热潮红的发展或进展的方法,其包括将有效量的抗CGRP拮抗剂抗体与至少一种用于治疗热潮红的另外的药剂组合施用于个体。此类另外的试剂包括但不限于基于激素的治疗剂,所述激素包括雌激素和/或一些孕酮。
- [0177] 在另一个方面,本公开提供治疗或减少受试者中头痛(例如,偏头痛)的发作的方法,其包括在多天将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体(例如,单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者。在一些实施方案中,在所述多天中的每天施用的单克隆抗体的量可介于

0.1mg-5000mg、1mg-5000mg、10mg-5000mg、100mg-5000mg、1000mg-5000mg、0.1mg-4000mg、1mg-4000mg、10mg-4000mg、100mg-4000mg、1000mg-4000mg、0.1mg-3000mg、1mg-3000mg、10mg-3000mg、100mg-3000mg、1000mg-3000mg、0.1mg-2000mg、1mg-2000mg、10mg-2000mg、100mg-2000mg、1000mg-2000mg、0.1mg-1000mg、1mg-1000mg、10mg-1000mg或100mg-1000mg之间。在一些实施方案中,该量介于100-2000mg之间。

[0178] 在另一个方面,本公开提供治疗或减少受试者中头痛(例如,偏头痛)的发作的方法,其包括以调节CGRP途径的量将单剂的单克隆抗体(例如,单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者。在一些实施方案中,该单剂可以是介于0.1mg-5000mg、1mg-5000mg、10mg-5000mg、100mg-5000mg、1000mg-5000mg、0.1mg-4000mg、1mg-4000mg、10mg-4000mg、100mg-4000mg、1000mg-4000mg、0.1mg-3000mg、1mg-3000mg、10mg-3000mg、100mg-3000mg、1000mg-3000mg、0.1mg-2000mg、1mg-2000mg、10mg-2000mg、100mg-2000mg、1000mg-2000mg、0.1mg-1000mg、1mg-1000mg、10mg-1000mg或100mg-1000mg之间的抗体的量。在一些实施方案中,该单剂可以是介于100-2000mg之间的抗体的量。

[0179] 在另一个方面,本公开提供治疗或减少受试者中至少一种血管舒缩症状的发作的方法,其包括在多天将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体(例如,单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者。在一些实施方案中,在所述多天中的每天施用的单克隆抗体的量可介于0.1mg-5000mg、1mg-5000mg、10mg-5000mg、100mg-5000mg、1000mg-5000mg、0.1mg-4000mg、1mg-4000mg、10mg-4000mg、100mg-4000mg、1000mg-4000mg、0.1mg-3000mg、1mg-3000mg、10mg-3000mg、100mg-3000mg、1000mg-3000mg、0.1mg-2000mg、1mg-2000mg、10mg-2000mg、100mg-2000mg、1000mg-2000mg、0.1mg-1000mg、1mg-1000mg、10mg-1000mg或100mg-1000mg之间。在一些实施方案中,该量介于100-2000mg之间。

[0180] 在另一个方面,本公开提供减少受试者经历的每月头痛小时数的方法,其包括将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体(例如,单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者。在一些实施方案中,在单剂后该单克隆抗体的量能够有效减少每月头痛小时数至少0.1、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多个头痛小时。在一些实施方案中,该单克隆的量在单剂后能够有效减少每月头痛小时数至少20个头痛小时。在一些实施方案中,该单克隆抗体的量能够有效减少每月头痛小时数至少40个头痛小时。在一些实施方案中,该单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛小时数至少0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。在一些实施方案中,该单克隆的量在单剂后能够有效减少每月头痛小时数至少15%。

[0181] 在另一个方面,本公开提供减少受试者经历的每月头痛天数的方法,其包括将一定量的调节CGRP途径的单克隆抗体(例如,单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者。在一些实施方案中,该单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛天数至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个头痛天。在一些实施方案中,该单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛天数至少3个头痛天。在一些实施方案中,该单克隆抗体的量在单剂后能够有效减少每月头痛天数至少0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。

[0182] 在另一个方面,本公开提供减少受试者中抗头痛药的使用的方法,其包括将调节CGRP途径的单克隆抗体(例如,单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者。在一些实施方案中,该单克隆抗体的量能够有效减少受试者每月使用抗头痛药至少0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。在一些实施方案中,该单克隆抗体的量能够有效减少受试者每月使用抗头痛药至少15%。该抗头痛药可以是本文别处描述的任何类型的抗头痛药。抗头痛药的非限制性实例包括5-HT₁激动剂(以及作用于其它5-HT₁位点的激动剂)、曲坦(例如,舒马曲坦、佐米曲坦、那拉曲坦、利扎曲坦、依立曲坦、阿莫曲坦、夫罗曲坦)、麦角生物碱(例如,酒石酸麦角胺、马来酸麦角新碱和甲磺酸二氢麦角碱(例如,酒石酸麦角胺、马来酸麦角新碱和甲磺酸二氢麦角碱(例如,甲磺酸二氢麦角柯宁碱、甲磺酸二氢麦角克碱、甲磺酸二氢麦角环肽和甲磺酸二氢麦角胺(DHE 45))和非甾类抗炎剂(NSAID)(例如,阿司匹林、双氯芬酸、二氟尼柳、依托度酸、芬布芬、非诺洛芬、氟苯柳、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、酮咯酸、甲氯芬那酸、甲芬那酸、萘丁美酮、萘普生、噁丙嗪、苯基丁氮酮、吡罗昔康、舒林酸、托美丁或佐美酸、环加氧酶-2(COX-2)抑制剂、塞来昔布;罗非昔布;美洛昔康;JTE-522;L-745,337;NS398;或它们的药学上可接受的盐)、阿片制剂(例如,羟考酮)以及β-肾上腺素能拮抗剂(例如,普萘洛尔)。

[0183] 关于本文所述的所有方法,提及抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)还包括包含一种或多种这些药剂的组合物。因此,此类组合物可根据涉及本文所述的抗体的方法使用。这些组合物还可包含合适的赋形剂,诸如本文别处描述的药学上可接受的赋形剂。本发明可单独或与其它常规治疗方法组合使用。

[0184] 本文所述的抗体(例如,单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)可以任何治疗剂量、通过任何合适的途径以及以任何合适的制剂施用于个体或受试者。本领域的技术人员将显而易见的是,本文所述的实例并非意图进行限制,而是对可用技术的说明。因此,在一些实施方案中,本文所述的抗体可根据已知的方法施用于个体,诸如静脉内施用,例如以丸剂或通过在规定时间内连续输注、通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、舌下、动脉内、滑膜内、通过吸入、鞘内、口服、吸入、鼻内(例如,吸入或非吸入)、颊面、直肠、经皮、心内、骨内、真皮内、经粘膜、阴道、玻璃体内、关节周、局部、表皮或外用途径施用。施用可以是全身的,例如静脉内施用,或局部的。可将市售的液体制剂的喷雾器,包括射流喷雾器和超声喷雾器用于施用。液体制剂可直接雾化,而冻干粉末可在复溶后雾化。或者,本文所述的抗体可使用碳氟化合物制剂和定量吸入器气雾化,或以冻干和研磨粉末吸入。

[0185] 在一些实施方案中,本文所述的抗体可通过位点特异性或靶向局部递送技术施用。位点特异性或靶向局部递送技术的实例包括抗体的各种可植入积存源或局部递送导管,诸如输注导管、留置导管或针导管、合成移植物、外膜包套、分流管和支架或其它可植入的设备、位点特异性载体、直接注射或直接施用。参见例如,PCT公布No. WO 00/53211和美国专利No. 5,981,568。

[0186] 本文所述的抗体的各种制剂均可用于施用。在一些实施方案中,抗体以纯的形式施用。在一些实施方案中,抗体和药学上可接受的赋形剂可以是各种制剂的形式。药学上可

接受的赋形剂是本领域已知的,并且是有益于药理学上有效的物质的施用的相对惰性的物质。例如,赋形剂可赋予形式或稠度,或作为稀释剂。合适的赋形剂包括但不限于稳定剂、润湿和乳化剂、不同渗透压摩尔浓度的盐、包封剂、缓冲剂和皮肤渗透促进剂。用于肠道外和非肠道外药物递送的赋形剂以及制剂在Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, Mack Publishing (2000) 所公开。

[0187] 在一些实施方案中,这些药剂(包括本文所述的抗体)可配制用于通过注射施用(例如,腹膜内、静脉内、皮下、肌内等)。因此,这些药剂可与药学上可接受的媒介物,诸如盐水、林格氏(Ringer)溶液、葡萄糖溶液等等组合。特定剂量方案,即剂量、时间安排和重复服用,将取决于特定个体和该个体的病史。

[0188] 在一些实施方案中,这些药剂(包括本文所述的抗体)可配制用于外周施用。此类制剂可通过任何合适的外周途径(包括静脉内和皮下)经由外周施用。所制备的用于外周施用的药剂可包括非中枢、脊髓、鞘内或直接引入CNS所递送的物质、药物和/或抗体。外周施用途径的非限制性实例包括口服、舌下、颊面、外用、直肠、通过吸入、经皮、皮下、静脉内、动脉内、肌内、心内、骨内、真皮内、腹膜内、经粘膜、阴道、玻璃体内、关节内、关节周、局部或表皮途径。

[0189] 可制备根据本公开使用的抗体的治疗制剂用于存储和/或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、赋形剂或稳定剂混合来使用(Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, Mack Publishing (2000)), 并且在一些情况下可以是冻干制剂或水溶液的形式。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用的剂量和浓度下对受者是无毒的。抗体的治疗制剂可包含一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,其中这些物质的非限制性实例包括缓冲剂,诸如磷酸、柠檬酸和其它有机酸;盐,诸如氯化钠;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯己双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸(例如,浓度为0.1mM至100mM、0.1mM至1mM、0.01mM至50mM、1mM至50mM、1mM至30mM、1mM至20mM、10mM至25mM),诸如甘氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、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、甘露糖或糊精;螯合剂(例如,浓度为0.001mg/mL至1mg/mL、0.001mg/mL至1mg/mL、0.001mg/mL至0.1mg/mL、0.001mg/mL至0.01mg/mL、0.01mg/mL至0.1mg/mL),诸如EDTA(例如,乙二胺四乙酸二钠二水合物);糖(例如,浓度为1mg/mL至500mg/mL、10mg/mL至200mg/mL、10mg/mL至100mg/mL、50mg/mL至150mg/mL),诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如,锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂(例如,浓度为0.01mg/mL至10mg/mL、0.01mg/mL至1mg/mL、0.1mg/mL至1mg/mL、0.01mg/mL至0.5mg/mL)诸如,TWEEN™(例如,聚山梨酸酯(例如,聚山梨酸酯20、聚山梨酸酯40、聚山梨酸酯60、聚山梨酸酯80))、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0190] 抗体制剂可就多种物理性质中的任一种而言进行表征。例如,对于治疗功效、安全性和存储,液体抗体制剂可具有任何合适的pH。例如,液体抗体制剂的pH可为pH4至约pH9、pH5至pH8、pH5至pH7或pH6至pH8。在一些实施方案中,液体抗体制剂可具有3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10或更高或更低的pH。

[0191] 在另一个实例中,对于治疗功效、安全性和存储,液体抗体制剂可具有任何合适的粘度。例如,液体抗体制剂的粘度在25℃下可为0.5厘泊(cP)至100cP、1cP至50cP、1cP至20cP、1cP至15cP或5cP至15cP。在一些实施方案中,液体抗体制剂在25℃下可具有0.5cP、1cP、1.2cP、1.4cP、1.6cP、1.8cP、2.0cP、2.2cP、2.4cP、2.6cP、2.8cP、3.0cP、3.2cP、3.4cP、3.6cP、3.8cP、4.0cP、4.2cP、4.4cP、4.6cP、4.8cP、5.0cP、5.2cP、5.4cP、5.6cP、5.8cP、6.0cP、6.2cP、6.4cP、6.6cP、6.8cP、7.0cP、7.2cP、7.4cP、7.6cP、7.8cP、8.0cP、8.2cP、8.4cP、8.6cP、8.8cP、9.0cP、9.2cP、9.4cP、9.6cP、9.8cP、10.0cP、10.2cP、10.4cP、10.6cP、10.8cP、11.0cP、11.2cP、11.4cP、11.6cP、11.8cP、12.0cP、12.2cP、12.4cP、12.6cP、12.8cP、13.0cP、13.2cP、13.4cP、13.6cP、13.8cP、14.0cP、14.2cP、14.4cP、14.6cP、14.8cP或15.0cP的粘度,或该粘度可为更高或更低。

[0192] 在另一个实例中,对于治疗功效、安全性和存储,液体抗体制剂可具有任何合适的电导率。例如,液体抗体制剂的电导率可为0.1毫西门子/厘米(mS/cm)至15mS/cm、0.1mS/cm至10mS/cm、0.1mS/cm至5mS/cm、0.1mS/cm至2mS/cm或0.1mS/cm至1.5mS/cm。在一些实施方案中,液体抗体制剂可具有0.19mS/cm、0.59mS/cm、1.09mS/cm、1.19mS/cm、1.29mS/cm、1.39mS/cm、1.49mS/cm、1.59mS/cm、1.69mS/cm、1.79mS/cm、1.89mS/cm、1.99mS/cm、2.09mS/cm、2.19mS/cm、2.29mS/cm、2.39mS/cm、2.49mS/cm、2.59mS/cm、2.69mS/cm、2.79mS/cm、2.89mS/cm、2.99mS/cm、3.09mS/cm、3.19mS/cm、3.29mS/cm、3.39mS/cm、3.49mS/cm、3.59mS/cm、3.69mS/cm、3.79mS/cm、3.89mS/cm、3.99mS/cm、4.09mS/cm、4.19mS/cm、4.29mS/cm、4.39mS/cm、4.49mS/cm、4.59mS/cm、4.69mS/cm、4.79mS/cm、4.89mS/cm、4.99mS/cm、5.09mS/cm、6.09mS/cm、6.59mS/cm、7.09mS/cm、7.59mS/cm、8.09mS/cm、8.59mS/cm、9.09mS/cm、9.59mS/cm、10.09mS/cm、10.59mS/cm、11.09mS/cm、11.59mS/cm、12.09mS/cm、12.59mS/cm、13.09mS/cm、13.59mS/cm、14.09mS/cm、14.59mS/cm或15.09mS/cm的电导率,或该电导率可为更高或更低。

[0193] 在另一个实例中,对于治疗功效、安全性和存储,液体抗体制剂可具有任何合适的渗透压摩尔浓度。例如,液体抗体制剂的渗透压摩尔浓度(osmolality)可为50毫渗透压摩尔/千克(mOsm/kg)至5000mOsm/kg、50mOsm/kg至2000mOsm/kg、50mOsm/kg至1000mOsm/kg、50mOsm/kg至750mOsm/kg或50mOsm/kg至500mOsm/kg。在一些实施方案中,液体抗体制剂可具有50mOsm/kg、60mOsm/kg、70mOsm/kg、80mOsm/kg、90mOsm/kg、100mOsm/kg、120mOsm/kg、140mOsm/kg、160mOsm/kg、180mOsm/kg、200mOsm/kg、220mOsm/kg、240mOsm/kg、260mOsm/kg、280mOsm/kg、300mOsm/kg、320mOsm/kg、340mOsm/kg、360mOsm/kg、380mOsm/kg、400mOsm/kg、420mOsm/kg、440mOsm/kg、460mOsm/kg、480mOsm/kg、500mOsm/kg、520mOsm/kg、540mOsm/kg、560mOsm/kg、580mOsm/kg、600mOsm/kg、620mOsm/kg、640mOsm/kg、660mOsm/kg、680mOsm/kg、700mOsm/kg、720mOsm/kg、740mOsm/kg、760mOsm/kg、780mOsm/kg、800mOsm/kg、820mOsm/kg、840mOsm/kg、860mOsm/kg、880mOsm/kg、900mOsm/kg、920mOsm/kg、940mOsm/kg、960mOsm/kg、980mOsm/kg、1000mOsm/kg、1050mOsm/kg、1100mOsm/kg、1150mOsm/kg、1200mOsm/kg、1250mOsm/kg、1300mOsm/kg、1350mOsm/kg、1400mOsm/kg、1450mOsm/kg、1500mOsm/kg的渗透压摩尔浓度,或该渗透压摩尔浓度可为更高或更低。

[0194] 包含抗体的脂质体可通过本领域已知的方法制备,诸如Epstein等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA82:3688(1985);Hwang等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030

(1980);以及美国专利No.4,485,045和4,544,545所述。具有增加循环时间的脂质体如美国专利No.5,013,556所公开。特别有用的脂质体可通过使用脂质组合物的反相蒸发法生成,该脂质组合物包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)。脂质体通过确定孔径的过滤器挤出,得到具有所需直径的脂质体。

[0195] 活性成分也可捕集到微胶囊中,该微胶囊例如通过凝聚技术或通过界面聚合(例如分别地羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中或在粗乳液中制备。此类技术如Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, Mack Publishing (2000) 所公开。

[0196] 可制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括包含抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成型制品形式,例如膜或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-甲基丙烯酸羟乙酯)或‘聚(乙烯醇)’)、聚交酯(美国专利No.3,773,919)、L-谷氨酸和7-乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解乙烯-乙酸乙烯、可降解乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)、乙酸异丁酸蔗糖酯和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0197] 用于体内施用的制剂通常应为无菌的。这很容易通过例如过滤实现,该过滤通过无菌滤膜进行。治疗性抗体组合物通常置于具有无菌入口的容器中,例如具有塞子的静脉输液袋或瓶,该塞子可被皮下注射针刺穿。

[0198] 根据本发明的组合物可以是用于口服、肠道外或直肠施用,或通过吸入或吹入施用的单位剂型,诸如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、溶液或悬浮液或栓剂。在一些情况下,单位剂型可以预填充容器(例如,预填充注射器)提供,该预填充容器用于将单位剂量施用于受试者。

[0199] 对于制备固体组合物诸如片剂,主要活性成分可与药用载体混合,该药用载体例如常规制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、磷酸二钙或树胶和其它药物稀释剂,例如水,以形成包含本发明的化合物或其无毒药学上可接受的盐的均质混合物的固体预制剂组合物。当提及这些预制剂组合物为均质的时,意指活性成分均匀分散于整个组合物中,使得组合物可易于再分为等同有效的单位剂型,诸如片剂、丸剂和胶囊剂。然后将该固体预制剂组合物再分为包含0.1至约500mg本发明的活性成分的上述类型的单位剂型。新型组合物的片剂或丸剂可以是包衣的或配混的,从而得到提供长效作用优势的剂型。例如,片剂或丸剂可包含内部剂量和外部剂量组分,后者为前者之上的包层的形式。两种组分可通过肠溶层分离,该肠溶层在胃中起到抵抗崩解的作用,并且允许内部组分完整地通过十二指肠或延迟释放。多种材料可用于此类肠溶层或包衣,此类材料包括多种聚合酸和聚合酸与例如紫胶、鲸蜡醇和乙酸纤维素的材料的混合物。

[0200] 合适的表面活性剂包括特别是非离子试剂,诸如聚氧乙烯脱水山梨糖醇(例如Tween™ 20、40、60、80或85)和其它脱水山梨糖醇(例如Span™ 20、40、60、80或85)。具有表面活性剂的组合物将便利地包含介于0.05和5%之间的表面活性剂,并且可介于0.1和2.5%之间。应当理解,如果需要,可加入其它成分,例如甘露糖醇或其它药学上可接受的媒介物。

[0201] 合适的乳液可使用市售的脂肪乳液,诸如Intralipid™、Liposyn™、Infonutrol™、

LipofundinTM和LipiphysanTM制备。活性成分可溶解于预混合的乳液组合物,或者可溶解于油(例如,大豆油、红花油、棉籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)以及在与磷脂(例如,卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)和水混合时形成的乳液中。应当理解,可加入其它成分,例如甘油或葡萄糖,以调整乳液的张度。合适的乳液通常包含最多至20%的油,例如介于5和20%之间。脂肪乳液可包含介于0.1和1.0 ml之间,特别是介于0.1和0.5 ml之间的脂肪滴,并且具有在5.5至8.0的范围内的pH。

[0202] 乳液组合物可以通过将抗体与IntralipidTM或其组分(大豆油、卵磷脂、甘油和水)混合来制备的那些乳液组合物。

[0203] 用于吸入或吹入的组合物包括药学上可接受的水性或有机溶剂中的溶液和悬浮液或它们的混合物,以及粉末。液体或固体组合物可包含上文所述的合适的药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,组合物通过口服或鼻腔吸入途径施用,以产生局部或全身效应。在优选地无菌药学上可接受的溶剂中的组合物可使用气体雾化。雾化的溶液可直接从雾化设备吸入,或雾化设备可连接至面罩、帐篷或间歇正压呼吸机。溶液、悬浮液或粉末组合物可优选地从设备口服或鼻腔施用,该设备以适当方式递送制剂。

[0204] 在一些实施方案中,可制备包含本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)的制剂用于任何合适的施用途径,该制剂的抗体量在0.1mg至3000mg、1mg至1000mg、100至1000mg或100至500mg的范围内。在一些情况下,包含本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)的制剂可包含至多或至少0.1mg、1mg、100mg、1mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、125mg、150mg、175mg、200mg、225mg、250mg、275mg、300mg、325mg、350mg、375mg、400mg、450mg、475mg、500mg、525mg、550mg、575mg、600mg、625mg、650mg、675mg、700mg、725mg、750mg、775mg、800mg、825mg、850mg、875mg、900mg、925mg、950mg、975mg、1000mg、1100mg、1200mg、1300mg、1400mg、1500mg、1600mg、1700mg、1800mg、1900mg、2000mg或3000mg的抗体量。

[0205] 在一些实施方案中,可制备包含本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)的液体制剂用于任何合适的施用途径,其中抗体浓度在0.1至500mg/mL、0.1至375mg/mL、0.1至250mg/mL、0.1至175mg/mL、0.1至100mg/mL、1mg/mL至500mg/mL、1mg/mL至375mg/mL、1mg/mL至300mg/mL、1mg/mL至250mg/mL、1mg/mL至200mg/mL、1mg/mL至150mg/mL、1mg/mL至100mg/mL、10mg/mL至500mg/mL、10mg/mL至375mg/mL、10mg/mL至250mg/mL、10mg/mL至150mg/mL、10mg/mL至100mg/mL、100mg/mL至500mg/mL、100mg/mL至450mg/mL、100mg/mL至400mg/mL、100mg/mL至350mg/mL、100mg/mL至300mg/mL、100mg/mL至250mg/mL、100mg/mL至200mg/mL或100mg/mL至150mg/mL的范围内。在一些实施方案中,液体制剂可包含浓度为至多、至少或小于0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490或500mg/mL的本文所述的抗体。

[0206] 抗体制剂可包含一种或多种组分,该组分包括本文别处描述的抗体和其它物质。对于抗体的治疗功效、安全性和存储,该抗体和其它组分可具有任何合适的量和/或任何合

适的浓度。在一个实例中,抗体制剂可以是包含51.4mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、20mM组氨酸、0.1mg/mL甲硫氨酸、84mg/mL海藻糖二水合物、0.05mg/mL乙二胺四乙酸二钠二水合物和0.2mg/mL聚山梨酸酯80的溶液。

[0207] 在另一个实例中,抗体制剂可包含200mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、15mM精氨酸、78mg/mL蔗糖、0.3mg/mL EDTA和0.1mg/mL聚山梨酸酯80。

[0208] 在另一个实例中,抗体制剂可包含175mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、20mM甘氨酸、88mg/mL海藻糖二水合物、0.015mg/mL EDTA和0.25mg/mL聚山梨酸酯80。

[0209] 在另一个实例中,抗体制剂可包含225mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、23mM天冬酰胺、84mg/mL山梨糖醇、0.1mg/mL EDTA和0.15mg/mL聚山梨酸酯60。

[0210] 在另一个实例中,抗体制剂可包含150mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、17mM天冬酰胺、74mg/mL甘露糖醇、0.025mg/mL EDTA和0.2mg/mL聚山梨酸酯80。

[0211] 在另一个实例中,抗体制剂可包含100mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、16mM精氨酸、87mg/mL甘露糖醇、0.025mg/mL EDTA和0.15mg/mL聚山梨酸酯20。

[0212] 在另一个实例中,抗体制剂可包含250mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、25mM组氨酸、74mg/mL甘露糖醇、0.025mg/mL EDTA和0.25mg/mL聚山梨酸酯20。

[0213] 在另一个实例中,抗体制剂可包含50mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、19mM精氨酸、84mg/mL蔗糖、0.05mg/mL EDTA和0.3mg/mL聚山梨酸酯80。

[0214] 在另一个实例中,抗体制剂可包含125mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、22mM甘氨酸、79mg/mL海藻糖二水合物、0.15mg/mL EDTA和0.15mg/mL聚山梨酸酯80。

[0215] 在另一个实例中,抗体制剂可以是包含175mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、20mM组氨酸、0.1mg/mL甲硫氨酸、84mg/mL海藻糖二水合物、0.05mg/mL乙二胺四乙酸二钠二水合物和0.2mg/mL聚山梨酸酯80的溶液。

[0216] 在另一个实例中,抗体制剂可包含200mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、30mM精氨酸、78mg/mL蔗糖、0.3mg/mL EDTA和0.1mg/mL聚山梨酸酯80。

[0217] 在另一个实例中,抗体制剂可包含175mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、20mM甘氨酸、88mg/mL海藻糖二水合物、0.015mg/mL EDTA和0.15mg/mL聚山梨酸酯80。

[0218] 在另一个实例中,抗体制剂可包含150mg/mL抗体(例如,抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、20mM组氨酸、84mg/mL蔗糖、0.05mg/mL EDTA和0.2mg/mL聚山梨酸酯80。

[0219] 在另一个实例中, 抗体制剂可包含225mg/mL抗体(例如, 抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、23mM组氨酸、84mg/mL山梨糖醇、0.1mg/mL EDTA和0.15mg/mL聚山梨酸酯60。

[0220] 在另一个实例中, 抗体制剂可包含150mg/mL抗体(例如, 抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、17mM天冬酰胺、74mg/mL甘露糖醇、0.3mg/mL EDTA和0.2mg/mL聚山梨酸酯80。

[0221] 在另一个实例中, 抗体制剂可包含100mg/mL抗体(例如, 抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、16mM精氨酸、87mg/mL甘露糖醇、0.025mg/mL EDTA和0.25mg/mL聚山梨酸酯20。

[0222] 在另一个实例中, 抗体制剂可包含250mg/mL抗体(例如, 抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、25mM组氨酸、89mg/mL甘露糖醇、0.025mg/mL EDTA和0.25mg/mL聚山梨酸酯20。

[0223] 在另一个实例中, 抗体制剂可包含125mg/mL抗体(例如, 抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、29mM精氨酸、84mg/mL蔗糖、0.05mg/mL EDTA和0.3mg/mL聚山梨酸酯80。

[0224] 在另一个实例中, 抗体制剂可包含150mg/mL抗体(例如, 抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、25mM天冬酰胺、84mg/mL甘露糖醇、0.05mg/mL EDTA和0.2mg/mL聚山梨酸酯80。

[0225] 在另一个实例中, 抗体制剂可包含145mg/mL抗体(例如, 抗体G1、另一种抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)、22mM组氨酸、72mg/mL海藻糖二水合物、0.05mg/mL EDTA和0.1mg/mL聚山梨酸酯80。

[0226] 本文所述的抗体可使用任何合适的方法施用, 包括通过注射(例如, 腹膜内、静脉内、皮下、肌肉内等)施用。如本文所述, 抗体也可通过吸入施用。在一些情况下, 抗体可鼻腔施用(吸入或非吸入)。一般来讲, 对于本文所述的抗体的施用, 初始候选剂量可为约2mg/kg。就本发明的目的而言, 典型日剂量根据上述因素可在约3 μ g/kg至30 μ g/kg至300 μ g/kg至3mg/kg至30mg/kg至100mg/kg或更多中的任一者的范围内。例如, 可使用约1mg/kg、约2.5mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg和约25mg/kg的剂量。对于重复施用达数天或更长, 根据病症, 维持治疗直到症状的所需抑制的出现, 或直到实现足够的治疗水平, 例如减少疼痛。示例性给药方案包括施用约8.5mg/kg的初始剂量, 然后每周约2.8mg/kg抗体的维持剂量, 或然后每隔一周约2.8mg/kg的维持剂量。另一种示例性给药方案包括每月一次将100mg、125mg、150mg、200mg、225mg、250mg、275mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、675mg或900mg的剂量皮下施用于受试者。另一种示例性给药方案包括皮下施用675mg的初始剂量, 然后每月皮下施用225mg抗体的剂量。然而, 根据专业人员希望实现的药代动力学衰变模式, 可使用其它剂量方案。例如, 在一些实施方案中, 设想了每周给药一至四次。该治疗进程易于通过常规技术和测定监测。给药方案(包括所用的CGRP拮抗剂)可随时间推移而变化。

[0227] 在一些实施方案中, 本文所述并且施用于受试者的抗体(例如, 调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)的剂量或量可在0.1 μ g至3000mg、1mg至1000mg、100至1000mg、100至500mg、0.1mg至5000mg、1mg至4000mg、250mg至1000mg、

500mg至1000mg、100mg至900mg、400mg至900mg、10mg至3000mg、10mg至2000mg、100mg至2000mg、150mg至2000mg、200mg至2000mg、250mg至2000mg、300mg至2000mg、350mg至2000mg、400mg至2000mg、450mg至2000mg、500mg至2000mg、550mg至2000mg、600mg至2000mg、650mg至2000mg、700mg至2000mg、750mg至2000mg、800mg至2000mg、850mg至2000mg、900mg至2000mg、950mg至2000mg或1000mg至2000mg的范围内。在一些实施方案中,本文所述并且施用于受试者的抗体的剂量或量可为、可为至多、可小于或可为至少0.1 μ g、1 μ g、100 μ g、1mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、125mg、150mg、175mg、200mg、225mg、250mg、275mg、300mg、325mg、350mg、375mg、400mg、450mg、475mg、500mg、525mg、550mg、575mg、600mg、625mg、650mg、675mg、700mg、725mg、750mg、775mg、800mg、825mg、850mg、875mg、900mg、925mg、950mg、975mg、1000mg、1100mg、1200mg、1300mg、1400mg、1500mg、1600mg、1700mg、1800mg、1900mg、2000mg或3000mg。在一些实施方案中,该量介于100至2000mg之间。

[0228] 在一些实施方案中,本文所述并且施用于受试者的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)的剂量或量可在0.1至500、0.1至100、0.1至50、0.1至20、0.1至10、1至10、1至7、1至5或0.1至3mg/kg体重的范围内。在一些实施方案中,本文所述并且施用于受试者的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)的剂量或量可为、可为至多、可小于或可为至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、15.5、16.0、16.5、17.0、17.5、18.0、18.5、19.0、19.5、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475或500mg/kg体重。

[0229] 在一些实施方案中,一定剂量或量的本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者的频率可变化。在一些实施方案中,在整个治疗中可将单剂的抗体给予受试者。在一些实施方案中,一定剂量或量的抗体施用于受试者的频率是恒定的(例如,每月施用一次)。在一些实施方案中,一定剂量或量的本文所述的抗体施用于受试者的频率是可变的(例如,初始剂量,然后在一个月施用剂量,然后在三个月和七个月施用另外剂量)。在一些实施方案中,抗体施用于受试者的频率为至少、小于或为至多一次、两次、三次、四次、五次或六次/天。在一些实施方案中,抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者的频率为至少、小于或为至多一剂、两剂、三剂、四剂、五剂、六剂/天。

[0230] 在一些实施方案中,一定剂量或量的本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者的频率为至少、小于或为至多一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次或二十次/一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、十一天、十二天、十三天、十四天、十五天、十六天、十七天、十八天、十九天、二十天、二十一天、二十二天、二十三天、二十四天、二十五天、二十六天、二十七天、二十八天、二十九天、三十天、三十一天、三十二天、三十三天、三十四天、三十五天、三十六天、三十七天、三十八天、三十九天、四十天、四十一天、四十二天、四十三天、四十四

天、四十五天、四十六天、四十七天、四十八天、四十九天、五十天、五十五天、六十天、六十五天、七十天、七十五天、八十天、八十五天、九十天、九十五天、一百天、一百二十五天、一百五十天、一百八十天或两百天。

[0231] 在一些实施方案中,一定剂量或量的本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者的频率为至少、小于或为至多一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次或二十次/一周、两周、三周、四周、五周、六周、七周、八周、九周、十周、十一周、十二周、十三周、十四周、十五周、十六周、十七周、十八周、十九周、二十周、二十一、二十二周、二十三周、二十四周、二十五周、二十六周、二十七周、二十八周、二十九周、三十周、三十一周、三十二周、三十三周、三十四周、三十五周、三十六周、三十七周、三十八周、三十九周、四十周、四十一周、四十二周、四十三周、四十四周、四十五周、四十六周、四十七周、四十八周、四十九周、五十周、五十五周、六十周、六十五周、七十周、七十五周、八十天、八十五周、九十周、九十五周或一百周。在一些实施方案中,本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者的频率小于一剂、两剂、三剂、四剂、五剂、六剂、七剂、八剂、九剂、十剂、十一剂、十二剂、十三剂、十四剂或十五剂/周。

[0232] 在一些实施方案中,一定剂量或量的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者的频率为至少、小于或为至多一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次或二十次每一个月、每两个月、每三个月、每四个月、每五个月、每六个月、每七个月、每八个月、每九个月、每十个月、每十一个月、每十二个月、每十三个月、每十四个月、每十五个月、每十六个月、每十七个月或每十八个月。在一些实施方案中,本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者的频率小于一剂、两剂、三剂、四剂、五剂、六剂、七剂、八剂、九剂、十剂、十一剂、十二剂、十三剂、十四剂或十五剂/月。在一些实施方案中,一定剂量或量的抗体可施用(例如,皮下或静脉内)于受试者一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或更多次/月。

[0233] 在一些实施方案中,剂量或量为50mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1000mg、1050mg、1100mg、1150mg、1200mg、1250mg、1300mg、1350mg、1400mg、1450mg、1500mg、1550mg、1600mg、1650mg、1700mg、1750mg、1800mg、1850mg、1900mg、1950mg、2000mg、2050mg、2100mg、2150mg、2200mg、2250mg、2300mg、2350mg、2400mg、2450mg、2500mg、2550mg、2600mg、2650mg、2700mg、2750mg、2800mg、2850mg、2900mg、2950mg、3000mg或更多的抗体可施用(例如,皮下或静脉内)于受试者一次/月。在一些实施方案中,剂量或量介于0.1mg至5000mg、1mg至4000mg、10mg至3000mg、10mg至2000mg、100mg至2000mg、150mg至2000mg、200mg至2000mg、250mg至2000mg、300mg至2000mg、350mg至2000mg、400mg至2000mg、450mg至2000mg、500mg至2000mg、550mg至2000mg、600mg至2000mg、650mg至2000mg、700mg至2000mg、750mg至2000mg、800mg至2000mg、850mg至2000mg、900mg至2000mg、950mg至2000mg或1000mg至2000mg之间的抗体可施用(例如,皮下或静脉内)于受试者一次/月。在一些实施方案中,介

于100-2000mg之间的抗体施用一次/月。

[0234] 在一些实施方案中,剂量或量为50mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1000mg、1050mg、1100mg、1150mg、1200mg、1250mg、1300mg、1350mg、1400mg、1450mg、1500mg、1550mg、1600mg、1650mg、1700mg、1750mg、1800mg、1850mg、1900mg、1950mg、2000mg、2050mg、2100mg、2150mg、2200mg、2250mg、2300mg、2350mg、2400mg、2450mg、2500mg、2550mg、2600mg、2650mg、2700mg、2750mg、2800mg、2850mg、2900mg、2950mg、3000mg或更多的抗体可每三个月施用(例如,皮下或静脉内)于受试者。在一些实施方案中,剂量或量介于0.1mg至5000mg、1mg至4000mg、10mg至3000mg、10mg至2000mg、100mg至2000mg、150mg至2000mg、200mg至2000mg、250mg至2000mg、300mg至2000mg、350mg至2000mg、400mg至2000mg、450mg至2000mg、500mg至2000mg、550mg至2000mg、600mg至2000mg、650mg至2000mg、700mg至2000mg、750mg至2000mg、800mg至2000mg、850mg至2000mg、900mg至2000mg、950mg至2000mg或1000mg至2000mg之间的抗体可每三个月施用(例如,皮下或静脉内)于受试者。在一些实施方案中,450mg至2000mg之间每三个月一次或以更低的频率施用。

[0235] 在一些实施方案中,剂量或量为50mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1000mg、1050mg、1100mg、1150mg、1200mg、1250mg、1300mg、1350mg、1400mg、1450mg、1500mg、1550mg、1600mg、1650mg、1700mg、1750mg、1800mg、1850mg、1900mg、1950mg、2000mg、2050mg、2100mg、2150mg、2200mg、2250mg、2300mg、2350mg、2400mg、2450mg、2500mg、2550mg、2600mg、2650mg、2700mg、2750mg、2800mg、2850mg、2900mg、2950mg、3000mg或更多的抗体可每六个月施用(例如,皮下或静脉内)于受试者。在一些实施方案中,剂量或量介于0.1mg至5000mg、1mg至4000mg、10mg至3000mg、10mg至2000mg、100mg至2000mg、150mg至2000mg、200mg至2000mg、250mg至2000mg、300mg至2000mg、350mg至2000mg、400mg至2000mg、450mg至2000mg、500mg至2000mg、550mg至2000mg、600mg至2000mg、650mg至2000mg、700mg至2000mg、750mg至2000mg、800mg至2000mg、850mg至2000mg、900mg至2000mg、950mg至2000mg或1000mg至2000mg之间的抗体可每六个月施用(例如,皮下或静脉内)于受试者。在一些实施方案中,450mg至2000mg之间每六个月一次或以更低频率施用。

[0236] 在一些实施方案中,一定剂量或量的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者(例如,皮下或静脉内)的频率为至少、小于或为至多一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次或二十次/季度。可以理解,“季度”可以指四分之一年的时间段,或也可指日历季度,诸如1月1日-3月31日、4月1日-6月30日、7月1日-9月30日或10月1日-12月31日的时间段。在一些情况下,“季度”可以指大约三个月的时间段。

[0237] 在一些实施方案中,剂量或量为50mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1000mg、1050mg、1100mg、1150mg、1200mg、1250mg、1300mg、1350mg、1400mg、1450mg、1500mg、1550mg、1600mg、1650mg、1700mg、1750mg、1800mg、1850mg、1900mg、1950mg、2000mg、2050mg、2100mg、2150mg、2200mg、2250mg、2300mg、2350mg、2400mg、2450mg、2500mg、2550mg、2600mg、

2650mg、2700mg、2750mg、2800mg、2850mg、2900mg、2950mg、3000mg或更多的抗体可每季度施用(例如,皮下或静脉内)于受试者。在一些实施方案中,剂量或量介于0.1mg至5000mg、1mg至4000mg、10mg至3000mg、10mg至2000mg、100mg至2000mg、150mg至2000mg、200mg至2000mg、250mg至2000mg、300mg至2000mg、350mg至2000mg、400mg至2000mg、450mg至2000mg、500mg至2000mg、550mg至2000mg、600mg至2000mg、650mg至2000mg、700mg至2000mg、750mg至2000mg、800mg至2000mg、850mg至2000mg、900mg至2000mg、950mg至2000mg或1000mg至2000mg之间的抗体可每季度施用(例如,皮下或静脉内)于受试者。

[0238] 在一些实施方案中,一定剂量或量的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)的施用频率为至少、小于或为至多一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次或二十次每年、每两年、每三年、每四年或每五年。在一些实施方案中,抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者的频率小于一剂、两剂、三剂、四剂、五剂、六剂、七剂、八剂、九剂、十剂、十一剂、十二剂、十三剂、十四剂、十五剂、十六剂、十七剂、十八剂、十九剂或二十剂、二十一剂、二十二剂、二十三剂、二十四剂或二十五剂/年。

[0239] 在一些实施方案中,剂量或量为50mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1000mg、1050mg、1100mg、1150mg、1200mg、1250mg、1300mg、1350mg、1400mg、1450mg、1500mg、1550mg、1600mg、1650mg、1700mg、1750mg、1800mg、1850mg、1900mg、1950mg、2000mg、2050mg、2100mg、2150mg、2200mg、2250mg、2300mg、2350mg、2400mg、2450mg、2500mg、2550mg、2600mg、2650mg、2700mg、2750mg、2800mg、2850mg、2900mg、2950mg、3000mg或更多的抗体可每年一次施用于受试者。在一些实施方案中,剂量或量介于0.1mg至5000mg、1mg至4000mg、10mg至3000mg、10mg至2000mg、100mg至2000mg、150mg至2000mg、200mg至2000mg、250mg至2000mg、300mg至2000mg、350mg至2000mg、400mg至2000mg、450mg至2000mg、500mg至2000mg、550mg至2000mg、600mg至2000mg、650mg至2000mg、700mg至2000mg、750mg至2000mg、800mg至2000mg、850mg至2000mg、900mg至2000mg、950mg至2000mg或1000mg至2000mg之间的抗体可每年一次施用于受试者。在一些实施方案中,450mg至2000mg之间每年一次或以更低的频率施用。

[0240] 在一些实施方案中,方法可包括在多天将本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者。所述多天中的两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天或更多天可相隔超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75或更多天。在一些实施方案中,所述多天中的两天相隔超过一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、十一天、十二天、十三天、十四天、十五天、十六天、十七天、十八天、十九天、二十天、二十一天、二十二天、二十三天、二十四天、二十五天、二十六天、二十七天、二十八天、二十九天、三十天或更多天。此外,在一些实施方案中,在所述多天中的第一天施用的抗体的量可不同于(例如,高于或低于)在第二天施用的抗体的量。

[0241] 在一些实施方案中,可将初始剂量(例如,负荷剂量)的本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者,然后在所需间隔施用一个或多个另外剂量。在一些实施方案中,所述初始剂量和一个和多

个另外剂量是相同的剂量。在一些实施方案中,所述一个或多个另外剂量不同于初始剂量。在一些实施方案中,所述一个或多个另外剂量的施用频率是恒定的(例如,每个月)。在一些实施方案中,所述一个或多个另外剂量的施用频率是可变的(例如,在初始剂量后一个月施用另一个另外剂量,然后在初始剂量后三个月施用另一个另外剂量)。可使用初始负荷剂量、另外剂量的任何所期望的和/或治疗方案以及另外剂量的频率(例如,包括本文所述的那些频率)。示例性方案包括皮下施用675mg抗CGRP拮抗剂抗体的初始负荷剂量,然后以一个月间隔皮下施用225mg抗体的后续维持剂量。

[0242] 在一些实施方案中,可在一些实施方案中,可将0.1 μ g、1 μ g、100 μ g、1mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、125mg、150mg、175mg、200mg、225mg、250mg、275mg、300mg、325mg、350mg、375mg、400mg、450mg、475mg、500mg、525mg、550mg、575mg、600mg、625mg、650mg、675mg、700mg、725mg、750mg、775mg、800mg、825mg、850mg、875mg、900mg、925mg、950mg、975mg、1000mg、1500mg、2000mg或3000mg的初始剂量的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者,然后施用一个或多个0.1 μ g、1 μ g、100 μ g、1mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、125mg、150mg、175mg、200mg、225mg、250mg、275mg、300mg、325mg、350mg、375mg、400mg、450mg、475mg、500mg、525mg、550mg、575mg、600mg、625mg、650mg、675mg、700mg、725mg、750mg、775mg、800mg、825mg、850mg、875mg、900mg、925mg、950mg、975mg、1000mg、1500mg、2000mg或3000mg的另外剂量的抗体。

[0243] 在一些实施方案中,一定剂量或量的本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)可分为亚剂量,并且根据例如施用途径和/或所施用的特定制剂以多个亚剂量施用。例如,在其中皮下施用剂量的情况下,皮下剂量可分为多个亚剂量,并且每个亚剂量在不同的部位施用,以避免例如在单个部位进行较多的单次皮下注射。例如,900mg的皮下剂量可分为四个亚剂量,每个225mg,并且每个225mg剂量施用于不同的部位,这可有助于使每个部位注射的体积最小化。亚剂量的分配可相等(例如,4个相等的亚剂量)或可不相等(例如,4个亚剂量,其中2个亚剂量与其它亚剂量一样大)。

[0244] 在一些实施方案中,在治疗过程中施用于受试者的抗体剂量数可根据例如在受试者中实现的血管舒缩症状和/或头痛的发作减少而变化。在一些实施方案中,血管舒缩症状与头痛的形式(例如,偏头痛、慢性偏头痛、偶发性偏头痛、其它类型的头痛等)相关。例如,在治疗过程中施用的剂量数可为、可为至少或可为至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50。在一些情况下(例如,在其中受试者患有慢性偏头痛的情况下),治疗可无限期给予。在一些情况下,治疗可以是急性的,以使得将至多1、2、3、4、5或6剂施用于受试者进行治疗。

[0245] 在一些实施方案中,一定剂量(或亚剂量)或量的本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)可配制成液体制剂并施用(例如,通过皮下注射、通过静脉内注射)于受试者。在这种情况下,包含抗体的液体制剂的体积可根据例如液体制剂中抗体的浓度、抗体的所需剂量和/或所用的施用途径而变化。例如,包含本文所述的抗体并且施用(例如,通过注射,诸如例如皮下注射或静脉内注射)于受试者的液体制剂的体积可为0.001mL至10.0mL、0.01mL至5.0mL、0.1mL至5mL、0.1mL至

3mL、0.5mL至2.5mL或1mL至2.5mL。例如,包含本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)并且施用(例如,通过注射,诸如例如皮下注射、静脉内注射)于受试者的液体制剂的量可为、可为至少、可小于或可为至多0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0mL。

[0246] 在一些实施方案中,一定剂量(或亚剂量)或量的本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)可以预填充容器提供,该预填充容器用于将抗体施用于受试者。此类预填充容器可设计为自我施用或由他人施用。例如,一定剂量(或亚剂量)或量的本文所述的抗体可以预填充注射器中的液体制剂提供。在此类实例中,预填充注射器可设计为自我施用或由他人施用。在一些情况下,预填充注射器可设计为皮下施用和/或静脉内施用。

[0247] 就本发明的目的而言,抗体的适当剂量可取决于所用的抗体(或其组合物)、血管舒缩症状的类型和严重性、头痛(例如,偏头痛)或其它待治疗病症的类型和严重性(无论该试剂的施用出于预防性还是治疗性目的)、先前治疗、患者的病史和对该药剂的应答以及主治医生的判断。通常临床医生施用抗体直到剂量达到实现所需的结果。剂量和/或频率可在治疗过程中变化。

[0248] 经验考量(诸如半衰期)通常有助于剂量的确定。例如,与人免疫系统相容的抗体,诸如人源化抗体或全人抗体,可用于延长抗体的半衰期,并防止抗体受到宿主的免疫系统攻击。可在治疗过程中确定并调整施用频率,并且该施用频率通常但不一定基于头痛(例如,偏头痛)或其它病症的治疗和/或抑制和/或改善和/或延迟。或者,抗体的持续连续释放制剂可为适当的。用于实现持续释放的各种制剂和设备是本领域已知的。

[0249] 在一个实施方案中,在给予的一次或多次抗体施用的个体中,本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)的剂量可凭经验确定。将渐增剂量的抗体给予个体。为评估抗体的功效,可跟踪疾病的指标。

[0250] 根据本发明的方法施用抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体),取决于例如受者的生理条件(无论施用的目的是治疗性的还是预防性的)以及专业技术人员已知的其它因素,可以是连续的或间歇的。抗体的施用在预先选择的时间段内可以是基本上连续的,或可以是一系列间隔剂量,例如在头痛(例如,偏头痛)发展之前、期间或之后;之前;期间;之前和之后;期间和之后;之前和期间;或在头痛发展之前、期间和之后。施用可在可能产生头痛的任何事件之前、期间和/或之后。

[0251] 在一些实施方案中,可提供超过一种抗体。可提供至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种不同的或更多种抗体。一般来讲,那些抗体可具有不会相互产生不利影响的互补活性。本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)也可与其它CGRP拮抗剂或CGRP受体拮抗剂联合使用。例如,可使用一种或多种以下CGRP拮抗剂:涉及CGRP的反义分子(包括涉及编码CGRP的核酸的反义分子)、CGRP抑制化合物、CGRP结构类似物、结合CGRP的CGRP受体的显性负突变以及抗CGRP受体抗体。抗体也可与起到增强和/或补充其它药剂的有效性作用的该药剂联合使用。

[0252] 头痛的诊断和评估是本领域确立的。评估可根据主观度量诸如患者症状的表征进行。例如,偏头痛可根据以下标准诊断:1)偶发性头痛发作持续4至72小时;2)具有以下症状中的两者:单侧疼痛、悸动、胀缩加重以及中或重强度疼痛;以及3)以下症状中的一者:恶心或呕吐以及畏光或畏声。Goadsby等,N.Engl.J.Med.346:257-270,2002。在一些实施方案中,头痛(例如,偏头痛)的评估可通过本文别处描述的头痛小时进行。例如,头痛(例如,偏头痛)的评估可就每天头痛小时数、每周头痛小时数、每月头痛小时数和/或每年头痛小时数而言。在一些情况下,头痛小时数可由受试者报告。

[0253] 治疗功效可通过本领域熟知的方法评估。例如,可评估疼痛减轻。因此,在一些实施方案中,在施用抗CGRP抗体后1、2或几小时主观上观察疼痛减轻。在一些实施方案中,在施用抗CGRP抗体后主观上观察头痛发作频率。

[0254] 在一些实施方案中,本文所述的用于治疗或减少受试者中头痛发作的方法在长时间单次施用本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)后可减少头痛的发作。例如,在单次施用后头痛的发作可减少至少0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50或更多天。

[0255] 在一些实施方案中,本文所述的用于治疗或减少在受试者中头痛的发作的方法,在将一个或多个剂量的本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者后,可使受试者经历的头痛小时数从施用前水平减少。例如,在将一个或多个剂量的抗体施用于受试者后,受试者经历的每天头痛小时可从受试者的施用前水平减少0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24个头痛小时。在一些情况下,在将一个或多个剂量的抗体施用于受试者后,受试者经历的每天头痛小时可相对于受试者的施用前水平减少0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。在另一个实例中,在将一个或多个剂量的抗体施用于受试者后,受试者经历的每周头痛小时可从受试者的施用前水平减少0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75或更多个头痛小时。在一些情况下,在将一个或多个剂量的抗体施用于受试者后,受试者经历的每周头痛小时可相对于受试者的施用前水平减少0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。在另一个实例中,在将一个或多个剂量的抗体施用于受试者后,受试者经历的每月头痛小时数可从施用前水平减少0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125或更多个头痛小时。在一些情况下,在将一个或多个剂量的抗体施用于受试者后,受试者经历的每周头痛小时可相对于受试者的施用前水平减少0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。

[0256] 在一些实施方案中,本文所述的治疗或减少受试者中头痛的发作的方法,在将一个或多个剂量的本文所述的抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)施用于受试者后,可使受试者经历的头痛天数从施用前水平减少。例如,在将一个或多个剂量的抗体施用于受试者后,受试者经历的每周头痛天数可从受

试者的施用前水平减少0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5或7个头痛天。在一些情况下,在将一个或多个剂量的抗体施用于受试者后,受试者经历的每周头痛天数可相对于受试者的施用前水平减少0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。在另一个实例中,在将一个或多个剂量的抗体施用于受试者后,受试者经历的每月头痛天数可从施用前水平减少0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或更多个头痛天。

[0257] 在一些实施方案中,方法可包括将一种或多种另外的药剂与抗体(例如,调节CGRP途径的单克隆抗体、抗CGRP拮抗剂抗体、单克隆抗CGRP拮抗剂抗体)同时或贯序施用于受试者。在一些实施方案中,另外的药剂可以是抗头痛药,诸如本文别处描述的示例性抗头痛药(例如,5-HT₁激动剂、曲坦、麦角生物碱、阿片制剂、-肾上腺素能拮抗剂、NSAID)。在一些实施方案中,治疗效果可大于单独使用抗体或一种或多种另外的药剂。因此,可实现抗体和一种或多种另外的药剂之间的协同效应。在一些实施方案中,一种或多种另外的药剂可被受试者预防性摄取。

[0258] B. 抗CGRP拮抗剂抗体

[0259] 在一些实施方案中,本发明的方法使用的抗体可以是抗CGRP拮抗剂抗体。抗CGRP拮抗剂抗体可以指任何抗体分子,该抗体分子阻断、抑制或减少(包括显著)CGRP生物活性,包括CGRP信号转导介导的下游途径,诸如受体结合和/或对CGRP的细胞应答的引发。

[0260] 抗CGRP拮抗剂抗体可表现出以下特征中的任何一者或多者:(a)与CGRP结合;(b)阻断CGRP与其受体结合;(c)阻断或减少CGRP受体活化(包括cAMP活化);(d)抑制CGRP生物活性或CGRP信号转导功能介导的下游途径;(e)预防、改善或治疗任何方面的头痛(例如,偏头痛);(f)增加CGRP的清除;以及(g)抑制(减少)CGRP合成、生成或释放。抗CGRP拮抗剂抗体是本领域已知的。参见例如Tan等,Clin.Sci.(Lond).89:565-73,1995;Sigma(Missouri,US),产品编号C7113(克隆#4901);Plourde等,Peptides 14:1225-1229,1993。

[0261] 在一些实施方案中,抗体以抑制CGRP和/或CGRP途径(包括CGRP信号转导功能介导的下游途径)的方式与CGRP反应。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体识别人CGRP。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体结合人 α -CGRP和 β -CGRP。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体结合人和大鼠CGRP。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体结合具有CGRP的氨基酸25-37的C末端片段。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体结合CGRP的氨基酸25-37内的C末端表位。

[0262] 本发明所用的抗体可涵盖单克隆抗体、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、异源偶联抗体、单链(ScFv)、它们的突变体、包含抗体部分的融合蛋白(例如,结构域抗体)、人源化抗体以及包含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经修饰的构型(包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体以及共价修饰的抗体)。抗体可以是鼠、大鼠、人或任何其它起源(包括嵌合或人源化抗体)。

[0263] 在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体是人源化的。在一些实施方案中,该抗体是人的。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体是抗体G1(如本文所述)。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体包含表6示出的抗体G1或G1的变体的一个或多个CDR(诸如一个、两个、三个、四个、五个,或在一些实

施方案中,全部六个CDR)。在其它实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体包含图5示出的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)和图5示出的轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0264] 在一些实施方案中,抗体包含选自以下的轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR): (a) LCVR17(SEQ ID NO:58)和HCVR22(SEQ ID NO:59); (b) LCVR18(SEQ ID NO:60)和HCVR23(SEQ ID NO:61); (c) LCVR19(SEQ ID NO:62)和HCVR24(SEQ ID NO:63); (d) LCVR20(SEQ ID NO:64)和HCVR25(SEQ ID NO:65); (e) LCVR21(SEQ ID NO:66)和HCVR26(SEQ ID NO:67); (f) LCVR27(SEQ ID NO:68)和HCVR28(SEQ ID NO:69); (g) LCVR29(SEQ ID NO:70)和HCVR30(SEQ ID NO:71); (h) LCVR31(SEQ ID NO:72)和HCVR32(SEQ ID NO:73); (i) LCVR33(SEQ ID NO:74)和HCVR34(SEQ ID NO:75); (j) LCVR35(SEQ ID NO:76)和HCVR36(SEQ ID NO:77); 以及(k) LCVR37(SEQ ID NO:78)和HCVR38(SEQ ID NO:79)。本文提供了这些区的序列。抗体的其它实例描述于US20110305711、US20120294802、US20120294797和US20100172895中,这些专利以引用的方式并入本文。

[0265] 在一些实施方案中,该抗体包含经修饰的恒定区,诸如本文所述的免疫惰性恒定区。在一些实施方案中,该恒定区如Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; PCT专利申请No. PCT/GB99/01441; 和/或英国专利申请No. 9809951.8所述经修饰。在其它实施方案中,该抗体包含含有以下突变的人重链IgG2恒定区:A330P331至S330S331(氨基酸编号参考野生型IgG2序列)。Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624。在一些实施方案中,该抗体包含含有以下突变的IgG4的恒定区:E233F234L235至P233V234A235。在其它实施方案中,该恒定区未经N-连接糖基化。在一些实施方案中,该恒定区由于低聚糖连接残基(诸如Asn297)和/或作为恒定区中N-糖基化识别序列的一部分的侧翼残基的突变而未经N-连接糖基化。在一些实施方案中,该恒定区是未经N-连接糖基化的。该恒定区可以是由于酶切或在糖基化缺陷宿主细胞中表达而未经N-连接糖基化。

[0266] 抗CGRP拮抗剂抗体与CGRP(诸如人 α -CGRP)的结合亲和力(K_D)可为约0.02至约200nM。在一些实施方案中,该结合亲和力为约200nM、约100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM、约60pM、约50pM、约20pM、约15pM、约10pM、约5pM或约2pM中的任一者。在一些实施方案中,该结合亲和力小于约250nM、约200nM、约100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM或约50pM中的任一者。

[0267] 确定抗体与CGRP的结合亲和力的一种方式测定抗体的单功能Fab片段的结合亲和力。为获得单功能Fab片段,可用木瓜蛋白酶切割抗体(例如,IgG)或重组表达。抗体的抗CGRP Fab片段的亲和力可通过配备有预固定的链霉亲和素传感器芯片(SA)的表面等离子共振(Biacore3000TM表面等离子共振(SPR)系统,Biacore, INC, Piscataway NJ)使用HBS-EP运行缓冲液(0.01M HEPES, pH 7.4、0.15NaCl、3mM EDTA、0.005%v/v Surfactant P20)确定。生物素酰化人CGRP(或任何其它CGRP)可在HBS-EP缓冲液中稀释为浓度小于0.5 μ g/mL,并使用可变接触时间注入单个芯片通道,以实现两个抗原密度范围,50-200个应答单位(RU)用于详细动力学研究,或800-1,000RU用于筛选测定。再生研究显示,溶于25%v/v乙醇的25mM NaOH有效地移除了结合的Fab,同时在超过200次注射保持了芯片上CGRP的活性。通常,将系列稀释(浓度范围0.1-10x预计 K_D)的纯化Fab样品以100 μ L/分钟注射1min,然后进行解离最多2小时的时间。使用已知浓度的Fab(通过氨基酸分析测定)作为标准物,通过ELISA和/或SDS-PAGE电泳测定Fab蛋白的浓度。动力学缔合速率(k_{on})和解离速率

(k_{off}) 使用BIAevaluation程序,通过将数据全局拟合为1:1Langmuir结合模型来同时获得(Karlsson,R.Roos,H.Fagerstam,L.Petersson,B. (1994) .Methods Enzymology 6.99-110)。平衡解离常数(K_D) 值以 k_{off}/k_{on} 计算。该方案适用于确定抗体与任何CGRP的结合亲和力,该CGRP包括人CGRP、其它哺乳动物的CGRP(诸如,小鼠CGRP、大鼠CGRP、灵长类CGRP)以及不同形式的CGRP(诸如, α 和 β 型)。抗体的结合亲和力通常在25℃下测定,但也可在37℃下测定。

[0268] 抗体(包括抗CGRP拮抗剂抗体)可通过本领域已知的任何方法制备。如本文进一步描述,宿主动物免疫途径和计划通常与用于抗体刺激和生成的确立和常规技术一致。用于生成人和小鼠抗体的一般技术是本领域已知的,并且在本文中有所描述。

[0269] 预期任何哺乳动物受试者(包括人或其抗体产生细胞)均可被操纵用作产生哺乳动物(包括人)杂交瘤细胞系的基础。通常,给宿主动物腹膜内、肌肉、口服、皮下、足底和/或真皮内接种一定量的免疫原,包括本文所述的免疫原。

[0270] 杂交瘤可使用Kohler,B.和Milstein,C. (1975) Nature 256:495-497描述的或Buck,D.W.等,In Vitro,18:377-381 (1982) 修改的一般体细胞杂交技术从淋巴细胞和永生化骨髓瘤细胞制备。可用的骨髓瘤细胞系(包括但不限于X63-Ag8.653和来自Salk Institute,Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA的那些)均可用于杂交。一般来讲,该技术涉及使用融合剂诸如聚乙二醇,或通过本领域的技术人员熟知的电方法融合骨髓瘤细胞和淋巴细胞。在融合后,从融合培养基分离细胞,并在选择生长培养基(诸如次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷(HAT)培养基)上生长,以消除未杂交的母细胞。本文所述的补充有或未补充有血清的任何培养基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个替代,EBV永生化B细胞可用于生成本发明的单克隆抗体(例如,单克隆抗CGRP抗体)。扩大培养杂交瘤并亚克隆(如果需要),通过常规免疫测定程序(例如,放射性免疫测定、酶免疫测定或荧光免疫的)测定上清液的抗免疫原活性。

[0271] 可用作抗体来源的杂交瘤涵盖所有衍生物,生成对CGRP或它们的部分特异性的单克隆抗体的亲本杂交瘤的子代细胞。

[0272] 生成此类抗体的杂交瘤可使用已知程序在体外或体内生长。单克隆抗体可通过常规免疫球蛋白纯化程序,诸如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、色谱以及如果需要超滤从培养基或体液分离。当存在时,可以例如通过在吸附剂上运行制备(该吸附剂由附接到固相的免疫原制成),并且从所需的抗体洗脱或释放免疫原来移除不期望的活性。使用人CGRP或包含靶标氨基酸序列的片段免疫宿主动物可产生抗体群体(例如,单克隆抗体),该靶标氨基酸序列使用双功能或衍生化剂缀合到在待免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质,例如钥孔戚血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂,所述双功能或衍生化剂例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酸亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基缀合)、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。

[0273] 如果需要,可对所关注的抗体(例如,单克隆或多克隆抗CGRP拮抗剂抗体)测序,然后可将多核苷酸序列克隆至载体,用于表达或增殖。编码所关注的抗体的序列可维持在宿主细胞的载体中,然后可扩大培养宿主细胞并冷冻以便将来使用。在一个替代方案中,多核苷酸序列可用于遗传操纵,以使抗体“人源化”或提高亲和力,或抗体的其它特征。例如,可

使恒定区工程化为更类似人恒定区,从而在抗体用于在人体中进行临床试验和治疗时避免免疫应答。可能有利的是,遗传操纵抗体序列以获得更大的CGRP亲和力和更大的CGRP抑制功效。本领域的技术人员将显而易见的是,可对抗CGRP拮抗剂抗体作出一种或多种多核苷酸改变,而仍维持结合CGRP的能力。

[0274] 人源化单克隆抗体可包括四个一般步骤。它们是:(1) 确定起始抗体轻链和重链可变速构域的核苷酸和预测氨基酸序列;(2) 设计人源化抗体,即决定人源化过程期间使用哪种抗体框架区;(3) 实际人源化方法/技术以及(4) 人源化抗体的转染和表达。参见例如美国专利No.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。

[0275] 描述了包含来源于非人免疫球蛋白的抗原结合位点的多个“人源化”抗体分子,包括具有啮齿动物或经修饰的啮齿动物V区及其相关互补性决定区(CDR)的嵌合抗体,该互补性决定区融合至人恒定结构域。参见例如Winter等,Nature 349:293-299(1991),Lobuglio等,Proc.Nat.Acad.Sci.USA86:4220-4224(1989),Shaw等,J Immunol.138:4534-4538(1987)以及Brown等,Cancer Res.47:3577-3583(1987)。其它参考文献描述了在与适当的人抗体恒定结构域融合之前移植到人支撑框架区(FR)的啮齿动物CDR。参见例如Riechmann等,Nature 332:323-327(1988),Verhoeyen等,Science239:1534-1536(1988)和Jones等,Nature 321:522-525(1986)。另一个参考文献描述了由重组表面修饰啮齿动物框架区支撑的啮齿动物CDR。参见例如欧洲专利公布No.0519596。这些“人源化”分子设计为使得对啮齿动物抗人抗体分子的不期望的免疫应答最小化,这限制了人受者中那些部分的治疗施用的持续时间和有效性。例如,抗体恒定区可工程化为使其具有免疫惰性(例如,不触发补体裂解)。参见例如PCT公布No.PCT/GB99/01441、英国专利申请No.9809951.8。其它还可使用的人源化抗体的方法在Daugherty等,Nucl.Acids Res.19:2471-2476(1991)和美国专利No.6,180,377、6,054,297、5,997,867、5,866,692、6,210,671和6,350,861以及PCT公布No.WO 01/27160有所公开。

[0276] 在又一个替代方案中,全人抗体可使用市售的小鼠获得,该小鼠被工程化为表达特定人免疫球蛋白。设计为产生更期望的(例如,全人抗体)或更强烈的免疫应答的转基因动物也可用于生成人源化或人抗体。此类技术的实例为来自Abgenix,Inc.(Fremont,CA)的XenomouseTM和来自Medarex,Inc.(Princeton,NJ)的HuMAb-Mouse[®]和TC MouseTM。

[0277] 在一个替代方案中,抗体可使用本领域已知的任何方法重组制备和表达。在另一个替代方案中,抗体可通过噬菌体展示技术重组制备。参见例如美国专利No.5,565,332、5,580,717、5,733,743和6,265,150以及Winter等,Annu.Rev.Immunol.12:433-455(1994)。或者,噬菌体展示技术(McCafferty等,Nature 348:552-553(1990))可用于从未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因谱体外生成抗体和抗体片段。根据该技术,将抗体V结构域基因框内克隆至丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因,诸如M13或fd,并且展示为噬菌体颗粒表面上的功能抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝,另外根据抗体的功能性质进行选择的结果是编码表现出这些性质的抗体的基因的选择。因此,噬菌体模拟了B细胞的一些性质。噬菌体展示可以多种方式进行;评述参见例如Johnson,Kevin S.和Chiswell,David J.,Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)。V基因区段的多个来源可用于噬菌体展示。Clackson等,Nature 352:624-628(1991)从来源

于免疫小鼠脾脏的V基因的小随机组合文库分离了一系列各种抗噤唑酮抗体。可构建未免疫的人供体的V基因谱,并且根据Mark等,J.Mol.Biol.222:581-597(1991)或Griffith等,EMBO J.12:725-734(1993)所述的技术可基本上分离一系列各种抗原(包括自体抗原)的抗体。在天然免疫应答中,抗体基因高速累积突变(体细胞高频突变)。一些引入的改变将赋予高亲和力,并且在随后的抗原激发期间显示出高亲和力表面免疫球蛋白的B细胞优先复制和分化。该自然过程可利用称为“链改组”的技术模拟。Marks等,Bio/Technol.10:779-783(1992)。在该方法中,噬菌体展示获得的“初始”人抗体的亲和力可通过随后用从未免疫供体获得的V结构域基因的天然存在的变体库(库)替换重链和轻链V区基因来改善。该技术允许生成亲和力在pM-nM范围内的抗体和抗体片段。制备非常大的噬菌体抗体谱(也称为“所有的源文库”)的策略在Waterhouse等,Nucl.Acids Res.21:2265-2266(1993)中有所描述。基因改组也可用于从啮齿动物抗体衍生人抗体,其中所述人抗体具有与起始啮齿动物抗体的类似的亲和力和特异性。根据该方法(也称为“表位印迹”),由噬菌体展示技术获得的啮齿动物抗体的重链或轻链V结构域基因被人V结构域基因库替换,产生啮齿动物-人嵌合体。在抗原上选择的结果是分离能够恢复功能抗原结合位点的人可变区,即表位决定(印迹)伴侣的选择。当重复该过程以替换其余的啮齿动物V结构域时,得到人抗体(参见1993年4月1日公开的PCT公布No.WO 93/06213)。与传统的通过CDR移植使啮齿动物抗体人源化不同,该技术提供全人抗体,该全人抗体无啮齿动物起源的框架或CDR残基。

[0278] 显而易见的是,虽然上述讨论涉及人源化抗体,但所讨论的一般原理适用于定制用于例如狗、猫、灵长类、马和牛的抗体。还显而易见的是,可组合本文所述的人源化抗体的一个或多个方面,例如CDR移植、框架突变和CDR突变。

[0279] 抗体可通过如下方法重组制备:首先从宿主动物分离抗体和抗体产生细胞,获得基因序列,并且使用该基因序列在宿主细胞(例如,CHO细胞)中重组表达抗体。可使用的另一个方法是在植物(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有所公开。参见例如Peeters等,Vaccine 19:2756(2001);Lonberg,N.和D.Huszar Int.Rev.Immunol 13:65(1995);以及Pollock等,J Immunol Methods 231:147(1999)。用于制备抗体衍生物,例如人源化、单链等的方法是本领域已知的。

[0280] 免疫测定和流式细胞分选技术,诸如荧光活化细胞分选(FACS)也可用于分离对CGRP特异的抗体。

[0281] 抗体可结合多种不同的载体。载体可以是活化的和/或惰性的。熟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、天然和经修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。载体的性质可为可溶性的或不溶性的。本领域的技术人员将会知道用于结合抗体的其它合适载体,或将能够使用日常实验确定此类载体。在一些实施方案中,该载体包括靶向心肌的部分。

[0282] 编码单克隆抗体的DNA易于使用常规程序(例如,使用能够特异性结合编码单克隆抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)分离和测序。杂交瘤细胞作为此类DNA的优选的来源。一旦分离,该DNA即可置于表达载体(诸如,PCT公布No.WO 87/04462公开的表达载体)中,然后转染到宿主细胞(诸如,不另外产生免疫球蛋白的大肠杆菌(E.coli)细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞)中,以在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。参见例如PCT公布No.WO 87/04462。DNA也可例如通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列

取代同源的鼠序列(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编码序列来修饰。如此,制备具有本文的抗CGRP单克隆抗体的结合特异性的“嵌合”或“杂交”抗体。

[0283] 可使用本领域已知的方法鉴定或表征抗体(例如,抗CGRP拮抗剂抗体)和来源于抗体的多肽,据此检测和/或测量CGRP生物活性的减少、改善或中和。例如,抗CGRP拮抗剂抗体也可通过如下方法鉴定:将候选试剂与CGRP温育,并监测以下特征中的任何一者或多者:(a)与CGRP结合;(b)阻断CGRP与其受体结合;(c)阻断或减少CGRP受体活化(包括cAMP活化);(d)抑制CGRP生物活性或CGRP信号转导功能介导的下游途径;(e)预防、改善或治疗任何方面的头痛(例如,偏头痛);(f)增加CGRP的清除;以及(g)抑制(减少)CGRP合成、生成或释放。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体或多肽通过如下方法鉴定:将候选试剂与CGRP温育,并监测CGRP的结合和/或其生物活性的伴随减少或中和。结合测定可使用纯化的CGRP多肽,或使用天然表达或转染为表达CGRP多肽的细胞进行。在一个实施方案中,结合测定是竞争性结合测定,其中评估候选抗体与已知抗CGRP拮抗剂竞争CGRP结合的能力。该测定可以各种方式,包括ELISA方式进行。在其它实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体通过如下方法鉴定:将候选试剂与CGRP温育,并监测细胞表面上表达的CGRP受体活化的结合和伴随抑制。

[0284] 在初始鉴定后,可通过已知可测试靶标生物学活性的生物测定进一步确定和精炼候选抗体(例如,抗CGRP拮抗剂抗体)的活性。或者,生物测定可直接用于筛选候选物。例如,CGRP促进了应答细胞中的多个可测定变化。这些变化包括但不限于在细胞(例如,SK-N-MC细胞)中刺激cAMP。拮抗剂活性也可使用动物模型测量,诸如测量由刺激大鼠隐神经诱导的皮肤血管舒张。Escott等,Br.J.Pharmacol.110:772-776,1993。头痛(诸如,偏头痛)的动物模型还可用于测试拮抗剂抗体或多肽的功效。Reuter等,Functional Neurology(15)增刊3,2000。鉴定和表征抗CGRP拮抗剂抗体或多肽的一些方法在实施例详细描述。

[0285] 抗体(包括抗CGRP拮抗剂抗体)可使用本领域熟知的方法表征。例如,一种方法是鉴定抗体结合的表位或“表位作图”。存在多种本领域已知的绘制和表征蛋白质上表位的位置的方法,包括解析抗体-抗原复合物的晶体结构、竞争测定、基因片段表达测定和基于合成肽的测定,如例如Harlow和Lane,Using Antibodies,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1999的第11章所述。在另外的实例中,表位作图可用于确定抗CGRP拮抗剂抗体结合的序列。表位作图可从各种来源商购获得,例如Pepscan Systems(Edelhertweg 15,8219PH Lelystad,The Netherlands)。表位可以是线性表位,即包含在单链氨基酸中,或通过不一定包含在单链中的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,通过重组方式)各种长度的肽(例如,长度为至少4-6个氨基酸)并用于与抗CGRP拮抗剂抗体的结合测定。在另一个实例中,抗CGRP拮抗剂抗体结合的表位可在系统筛选中确定,该系统筛选通过使用来源于CGRP序列的重叠肽,并确定抗CGRP拮抗剂抗体的结合来进行。根据基因片段表达测定,编码CGRP的开放阅读框随机或通过特异性遗传构造片段化,并测定CGRP的表达片段与待测试的抗体的反应性。基因片段可以例如通过如下方法制备:PCR,然后在存在放射性氨基酸的情况下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CGRP片段的结合。某些表位也可通过使用噬菌体颗粒表面上展示的随机肽序列文库(噬菌体文库)鉴定。或者,可在简单结合测定中测试重叠肽片段的确定文库与测试抗体的结合。在

另外的实例中,可执行抗原结合结构域的诱变、结构域交换实验和丙氨酸扫描诱变以鉴定表位结合所需、充分和/或必要的残基。例如,结构域交换实验可使用突变CGRP进行,其中CGRP多肽的各种片段被密切相关、但抗原性不同的蛋白质(诸如,神经营养蛋白家族的另一个成员)的序列置换(交换)。通过评估抗体与突变CGRP的结合,可评估特定CGRP片段与抗体结合的重要性。

[0286] 可用于表征抗体(包括抗CGRP拮抗剂抗体)的另一种方法是使用与已知结合相同抗原(即,CGRP上各种片段)的其它抗体的竞争测定,以确定抗CGRP拮抗剂抗体是否与其它抗体结合相同的表位。竞争测定是本领域的技术人员熟知的。

[0287] 表达载体可用于指导抗体(包括抗CGRP拮抗剂抗体)的表达。本领域技术人员熟悉表达载体的施用,以获得外源性蛋白质的体内表达。参见例如美国专利No.6,436,908、6,413,942和6,376,471。表达载体的施用包括局部或全身施用,包括注射、口服施用、粒子枪或导管施用以及外用。在另一个实施方案中,表达载体直接施用到交感干或神经节,或施用到冠状动脉、心房、心室或心包膜。

[0288] 还可使用包含表达载体或次基因组多核苷酸的治疗组合物的靶向递送。受体介导的DNA递送技术在例如Findeis等,Trends Biotechnol. (1993) 11:202;Chiou等,Gene Therapeutics:Methods And Applications Of Direct Gene Transfer(J.A.Wolff编)(1994);Wu等,J.Biol.Chem. (1988) 263:621;Wu等,J.Biol.Chem. (1994) 269:542;Zenke等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1990) 87:3655;Wu等,J.Biol.Chem. (1991) 266:338中有所描述。在基因治疗方案中,包含多核苷酸的治疗组合物在约100ng至约200mg DNA的范围内局部施用。在基因治疗方案期间还可使用约500ng至约50mg、约1μg至约2mg、约5μg至约500g和约20μg至约100μg DNA的浓度范围。治疗性多核苷酸和多肽可使用基因递送媒介物递送。基因递送媒介物可以是病毒或非病毒起源的(一般参见Jolly,Cancer Gene Therapy (1994) 1:51;Kimura,Human Gene Therapy (1994) 5:845;Connelly,Human Gene Therapy (1995) 1:185以及Kaplit,Nature Genetics (1994) 6:148)。此类编码序列的表达可使用内源性哺乳动物启动子或异源性启动子诱导。编码序列的表达可以是组成型或调节的。

[0289] 用于递送所需多核苷酸和在所需细胞中表达的基于病毒的载体是本领域熟知的。示例性基于病毒的媒介物包括但不限于重组逆转录病毒(参见例如PCT公布No.WO 90/07936;WO 94/03622;WO93/25698;WO 93/25234;WO 93/11230;WO 93/10218;WO 91/02805;美国专利No.5,219,740和4,777,127;英国专利No.2,200,651;和欧洲专利No.0 345 242)、基于甲病毒的载体(例如,辛德毕斯病毒载体、塞姆利基森林病毒(ATCC VR-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))以及腺相关病毒(AAV)载体(参见例如PCT公布No.WO 94/12649;WO 93/03769;WO 93/19191;WO 94/28938;WO 95/11984和WO 95/00655)。还可利用杀伤腺病毒相关的DNA的施用,如Curiel,Hum.Gene Ther. (1992) 3:147所述。

[0290] 还可利用非病毒递送媒介物和方法,包括但不限于单独杀伤腺病毒连接或不连接的聚阳离子凝聚DNA(参见例如Curiel,Hum.Gene Ther. (1992) 3:147);连接配体的DNA(参见例如Wu,J.Biol.Chem. (1989) 264:16985);真核细胞递送媒介物细胞(参见例如美国专利No.5,814,482;PCT公布No.WO 95/07994;WO 96/17072;WO 95/30763和WO 97/42338)以及

与细胞膜的核电荷中和或融合。还可利用裸DNA。示例性裸DNA引入方法如PCT公布No. WO 90/11092和美国专利No. 5,580,859所述。可充当基因递送媒介物的脂质体在美国专利No. 5,422,120; PCT公布No. WO 95/13796; W094/23697; WO 91/14445和EP 0524968中有所描述。另外的方法在Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411和Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581中有所描述。

[0291] C. 抗体G1和相关抗体、多肽、多核苷酸、载体和宿主细胞

[0292] 本发明涵盖组合物,其包括包含表6示出的抗体G1及其变体或来源于表6示出的抗体G1及其变体的多肽的药物组合物;以及包含编码G1及其变体或多肽的序列的多核苷酸。在一些实施方案中,组合物包含一种或多种结合CGRP的抗体或多肽(其可以或不可以是抗体),和/或包含编码一种或多种结合CGRP的抗体或多肽的序列的一种或多种多核苷酸。这些组合物还可包含合适的赋形剂,诸如药学上可接受的赋形剂(包括缓冲剂),这些赋形剂是本领域熟知的。

[0293] 在一些实施方案中,本发明的抗CGRP拮抗剂抗体和多肽通过以下特征中的任何(一者或多者)表征:(a)与CGRP结合;(b)阻断CGRP与其受体结合;(c)阻断或减少CGRP受体活化(包括cAMP活化);(d)抑制CGRP生物活性或由CGRP信号转导功能介导的下游途径;(e)预防、改善或治疗任何方面的头痛(例如,偏头痛);(f)增加CGRP的清除;以及(g)抑制(减少)CGRP合成、生成或释放。

[0294] 在一些实施方案中,本发明提供任何以下项,或包含任何以下项的组合物(包括药物组合物):(a)表6示出的抗体G1或其变体;(b)表6示出的抗体G1或其变体的片段或区;(c)表6示出的抗体G1或其变体的轻链;(d)表6示出的抗体G1或其变体的重链;(e)表6示出的抗体G1或其变体的轻链和/或重链的一个或多个可变区;(f)表6示出的抗体G1或其变体的一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR);(g)抗体G1的重链的CDR H3;(h)表6示出的抗体G1或其变体的轻链的CDR L3;(i)表6示出的抗体G1或其变体的轻链的三个CDR;(j)表6示出的抗体G1或其变体的重链的三个CDR;(k)表6示出的抗体G1或其变体的轻链的三个CDR和重链的三个CDR;以及(l)包含(b)至(k)中的任一者的抗体。在一些实施方案中,本发明还提供包含上述中的任何一者或多者的多肽。

[0295] 抗体G1的CDR部分(包括Chothia和Kabat CDR)图示于图5中。CDR区的确定在本领域技术的范围内。应当理解,在一些实施方案中,CDR可以是Kabat和Chothia CDR的组合(也称为“组合CDR”或“延伸CDR”)。在一些实施方案中,CDR是Kabat CDR。在其它实施方案中,CDR是Chothia CDR。换言之,在超过一个CDR的实施方案中,CDR可以是Kabat、Chothia、组合CDR中的任一者或它们的组合。

[0296] 在一些实施方案中,本发明提供这样的多肽(其可以或可以不是抗体),其包括与表6示出的G1或其变体的至少一个CDR、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或全部六个CDR基本上相同的至少一个CDR、至少两个、至少三个或至少四个、至少五个或全部六个CDR。其它实施方案包括这样的抗体,其具有与G1或来源于G1的至少两个、三个、四个、五个或六个CDR基本上相同的至少两个、三个、四个、五个或六个CDR。在一些实施方案中,所述至少一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR与表6示出的G1或其变体的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR具有至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同性。应当理解,就本发明的目的而言,虽然与表6示出的G1或其变体相比,活性的

程度可变化(可以变大或变小),但通常保持了结合特异性和/或总体活性。

[0297] 在一些实施方案中,本发明还提供这样的多肽(其可以或可以不是抗体),其包含具有以下任何项的表6示出的G1或其变体的氨基酸序列:表6示出的G1或其变体的序列的至少5个连续氨基酸、至少8个连续氨基酸、至少约10个连续氨基酸、至少约15个连续氨基酸、至少约20个连续氨基酸、至少约25个连续氨基酸、至少约30个连续氨基酸,其中至少3个氨基酸来自表6示出的G1(图5)或其变体的可变区。在一个实施方案中,该可变区来自G1的轻链。在另一个实施方案中,该可变区来自G1的重链。示例性多肽具有来自G1的重链和轻链可变区二者的连续氨基酸(长度如上所述)。在另一个实施方案中,5个(或更多个)连续氨基酸来自图5示出的G1的互补性决定区(CDR)。在一些实施方案中,连续氨基酸来自G1的可变区。

[0298] 抗CGRP拮抗剂抗体和多肽与CGRP(诸如人 α -CGRP)的结合亲和力(K_D)可为约0.06至约200nM。在一些实施方案中,该结合亲和力为约200nM、100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM、约60pM、约50pM、约20pM、约15pM、约10pM、约5pM或约2pM中的任一者。在一些实施方案中,该结合亲和力小于约250nM、约200nM、约100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM或约50pM中的任一者。

[0299] 在一些实施方案中,本发明还提供制备这些抗体或多肽中的任一者的方法。本发明的抗体可通过本领域已知的程序制备。多肽可通过抗体的蛋白分解或其它降解、通过上述重组方法(即,单链或融合多肽)或通过化学合成制备。抗体的多肽,尤其是最多约50个氨基酸的较短的多肽,通过化学合成便利地制备。化学合成的方法是本领域已知的,并且可商购获得。例如,抗体可利用固相法通过自动化多肽合成仪制备。还可参见,美国专利No.5,807,715;4,816,567和6,331,415。

[0300] 在另一个替代方案中,抗体可使用本领域熟知的程序重组制备。在一个实施方案中,多核苷酸包含编码SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10示出的抗体G1的重链和/或轻链可变区的序列。在另一个实施方案中,将包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10示出的核苷酸序列多核苷酸克隆至用于表达或增殖的一个或多个载体。编码所关注的抗体的序列可维持在宿主细胞的载体中,然后可扩大培养宿主细胞并冷冻以便将来使用。本文还描述了载体(包括表达载体)和宿主细胞。

[0301] 在一些实施方案中,本发明还涵盖本发明的抗体诸如G1的单链可变区片段(“scFv”)。单链可变区片段通过使用短连接肽连接轻链和/或重链可变区来制备。Bird等,(1988)Science 242:423-426。连接肽的实例为(GGGGS)₃(SEQ ID NO:57),它跨接一个可变区的羧基末端和另一个可变区的氨基末端之间大约3.5nm。设计和使用了其它序列的接头。Bird等,(1988)。继而可修饰接头,以发挥另外的功能,诸如连接药物或连接至固相载体。可通过重组或合成制备单链变体。对于scFv的合成制备,可使用自动化合成仪。对于scFv的重组制备,可将包含编码scFv的多核苷酸的合适质粒引入合适的宿主细胞,真核细胞诸如酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞,或原核细胞诸如大肠杆菌。编码所关注的scFv的多核苷酸可通过常规操作(诸如多核苷酸的连接)制备。可使用本领域已知的标准蛋白质纯化技术分离所得的scFv。

[0302] 还涵盖其它形式的单链抗体,诸如双抗体。双抗体是二价、双特异性抗体,其中VH和VL结构域在多肽单链上表达,但使用较短的接头,以允许相同链上两个结构域之间的配对,从而使该结构域与另一条链的互补结构域配对,并形成两个抗原结合位点(参见例如,

Holliger, P. 等, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J. 等, (1994) *Structure* 2:1121-1123)。

[0303] 例如,可使用本文所公开的抗体制备具有对至少两种不同的抗原具有结合特异性的双特异性抗体、单克隆抗体。用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的(参见例如 Suresh 等, 1986, *Methods in Enzymology* 121:210)。传统上,双特异性抗体的重组产生基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两个重链具有不同的特异性 (Millstein 和 Cuello, 1983, *Nature* 305, 537-539)。

[0304] 根据一种制备双特异性抗体的方法,将具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变结构域融合至免疫球蛋白恒定结构域序列。优选地与免疫球蛋白重链恒定结构域(包含较链、CH2和CH3区的至少一部分)进行融合。优选的是,至少一种融合物中存在第一重链恒定区(CH1)(包含轻链结合必须的位点)。将编码免疫球蛋白重链融合物的DNA以及,如果需要,免疫球蛋白轻链插入单独的表达载体,并且共转染至合适的宿主生物。在不等比例的三条用于构造的多肽链提供最佳产率的实施方案中,这在调整三个多肽片段的相互比例方面提供了更大的灵活性。然而,当至少两条多肽链以相等的比例表达得到高产率时,或当该比率无特别意义时,将两条或全部三条多肽链的编码序列插入一个表达载体是可能的。

[0305] 在一种方法中,双特异性抗体由在一个臂中具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链,以及在另一个臂中的杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。该不对称结构在仅一半的双特异性分子中具有免疫球蛋白轻链,有利于从不需要的免疫球蛋白链组合中分离所需的双特异性化合物。该方法在1994年3月3日公开的PCT公布No. WO 94/04690中有所描述。

[0306] 包含两个共价连接的抗体的异偶联抗体也在本发明的范围内。此类抗体已用于使免疫系统细胞靶向不期望的细胞(美国专利No. 4,676,980),以及HIV感染的治疗(PCT专利申请公布No. WO 91/00360和WO 92/200373;EP 03089)。异偶联抗体可使用任何便利的交联法制备。合适的交联剂和技术是本领域熟知的,并且在美国专利No. 4,676,980中有所描述。

[0307] 嵌合或杂交抗体也可使用已知的合成蛋白质化学法,包括涉及交联剂的那些方法体外制备。例如,免疫毒素可使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键构造。用于该目的的合适的试剂的实例包括亚氨基硫醇酯和4-巯基丁酰亚氨酸甲酯。

[0308] 包含表6示出的抗体G1或其变体的一个或多个CDR,或来源于表6示出的抗体G1或其变体的一个或多个CDR的人源化抗体可使用本领域已知的任何方法制备。例如,可使用四个一般步骤使单克隆抗体人源化。

[0309] 在一些实施方案中,本发明涵盖对表6示出的抗体G1或其变体的修饰,包括对其性质无显著影响的功能等同的抗体和具有增加或减少的活性和/或亲和力的变体。例如,可使表6示出的抗体G1或其变体的氨基酸序列突变,以获得具有对CGRP的所需结合亲和力的抗体。多肽的修饰是本领域中的常规实践,并且不必在本文中详细描述。多肽的修饰在实施例中示例。经修饰的多肽的实例包括具有氨基酸残基的保守取代、一个或多个氨基酸的缺失或添加(它们不会显著有害地改变功能活性)的多肽,或使用化学类似物。

[0310] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至包含一百个或更多个残基的多肽的范围内的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例

包括具有N-末端甲硫胺酰基残基的抗体或融合至表位标签的抗体。抗体分子的其它插入变体包括融合至酶或多肽的抗体的N或C末端,这增加了抗体的血清半衰期。

[0311] 取代变体使抗体分子中的至少一个氨基酸残基移除,并将不同的残基插入该位置。取代诱变的最关注位点包括高变区,但还设想了FR改变。保守取代如表1的标题“保守取代”所示。如果此类取代导致生物活性改变,则可引入表1中名称为“示例性取代”的更多实质变化,或如下文参考氨基酸种类进一步描述,并筛选产物。

[0312] 表1:氨基酸取代

[0313]	初始残基	保守取代	示例性取代
	Ala (A)	Val	Val、Leu、Ile
	Arg (R)	Lys	Lys、Gln、Asn
[0314]	Asn (N)	Gln	Gln、His、Asp、Lys、Arg
	Asp (D)	Glu	Glu、Asn
	Cys (C)	Ser	Ser、Ala
	Gln (Q)	Asn	Asn、Glu
	Glu (E)	Asp	Asp、Gln
	Gly (G)	Ala	Ala
	His (H)	Arg	Asn、Gln、Lys、Arg
	Ile (I)	Leu	Leu、Val、Met、Ala、Phe、正亮氨酸
	Leu (L)	Ile	正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe
	Lys (K)	Arg	Arg、Gln、Asn
	Met (M)	Leu	Leu、Phe、Ile
	Phe (F)	Tyr	Leu、Val、Ile、Ala、Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr	Tyr、Phe
	Tyr (Y)	Phe	Trp、Phe、Thr、Ser
	Val (V)	Leu	Ile、Leu、Met、Phe、Ala、正亮氨酸

[0315] 抗体的生物性质的实质修饰通过选择它们对维持(a)取代区域中多肽主骨架的结构,例如折叠或螺旋构象,(b)靶标位点处分子的电荷或疏水性,或(c)侧链的位阻的作用显著不同的取代实现。根据常见的侧链的性质将天然存在的残基分为几组:

[0316] (1) 非极性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0317] (2) 极性不带电:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0318] (3) 酸性(带负电):Asp、Glu;

[0319] (4) 碱性(带正电):Lys、Arg;

[0320] (5) 影响链取向的残基:Gly、Pro;以及

[0321] (6) 芳族:Trp、Tyr、Phe、His。

[0322] 非保守取代通过将这些种类之一的成员交换为另一类来制备。

[0323] 通常还可使用丝氨酸取代任何不涉及维持抗体的正确构象的半胱氨酸残基,以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,可将半胱氨酸键加入抗体,以改善其稳定性,尤其是当抗体是抗体片段诸如Fv片段时。

[0324] 氨基酸修饰的范围可从改变或修饰一个或多个氨基酸至区诸如可变区的完全重

新设计。可变区的变化可改变结合亲和力和/或特异性。在一些实施方案中,在CDR结构域内作出不超过一个至五个保守氨基酸取代。在其它实施方案中,在CDR结构域内作出不超过一个至三个保守氨基酸取代。在其它实施方案中,CDR结构域是CDR H3和/或CDR L3。

[0325] 修饰还包括糖基化和非糖基化多肽,以及具有其它翻译后修饰诸如例如通过不同的糖来糖基化、乙酰化和磷酸化的多肽。抗体在其恒定区的保守位置糖基化(Jefferis和Lund,1997,Chem.Immunol.65:111-128;Wright和Morrison,1997,TibTECH 15:26-32)。免疫球蛋白的低聚糖侧链影响蛋白质的功能(Boyd等,1996,Mol.Immunol.32:1311-1318;Wittwe和Howard,1990,Biochem.29:4175-4180)和糖蛋白的部分之间的分子内相互作用,这可影响构象和所呈现的糖蛋白的三维表面(Hefferis和Lund,出处同上;Wyss和Wagner,1996,Current Opin.Biotech.7:409-416)。低聚糖也可用于根据特定识别结构将给定的糖蛋白靶向某些分子。还报告了抗体的糖基化影响抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。具体地讲,据报告,具有四环素调节的 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺转移酶III(GnTIII)表达、糖基转移酶催化的平头型GlcNAc形成的CHO细胞具有改善的ADCC活性(Umana等,1999,Mature Biotech.17:176-180)。

[0326] 抗体的糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接是指糖部分连接至天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸、天冬酰胺-X-苏氨酸和天冬酰胺-X-半胱氨酸(其中X为除脯氨酸之外的任何氨基酸)是糖部分与天冬酰胺侧链的酶连接的识别序列。因此,多肽中存在这些三肽序列中的任一者形成了潜在的糖基化位点。O-连接糖基化是指N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种糖连接至羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。

[0327] 糖基化位点加入抗体通过改变氨基酸序列,以使其包含上述三肽序列中的一者或多者而便利地实现(对于N-连接糖基化位点)。改变也可通过将个或多个丝氨酸或苏氨酸残基加入初始抗体的序列或取代进行(对于O-连接糖基化位点)。

[0328] 抗体的糖基化形式也可在不改变基本核苷酸序列的情况下改变。糖基化大部分取决于用于表达抗体的宿主细胞。由于作为潜在的治疗剂用于表达重组糖蛋白(例如抗体)的细胞类型很少是天然细胞,因此可预期抗体的糖基化形式的变化(参见例如Hse等,1997,J.Biol.Chem.272:9062-9070)。

[0329] 除宿主细胞的选择之外,在抗体的重组制备期间影响糖基化的因素包括生长模式、培养基制剂、培养物密度、氧合作用、pH、纯化方案等等。已提出在特定宿主生物中实现改变糖基化形式的各种方法,包括引入或过表达涉及低聚糖生成的某些酶(美国专利No.5,047,335、5,510,261和5,278,299)。糖基化或某些类型的糖基化可以例如使用内切糖苷酶H(Endo H)、N-糖苷酶F、内切糖苷酶F1、内切糖苷酶F2、内切糖苷酶F3从糖蛋白通过酶促移除。此外,重组宿主细胞可通过遗传工程改造为某些类型的多糖加工缺陷型。这些和类似技术是本领域熟知的。

[0330] 其它修饰方法包括使用本领域已知的连接技术,包括但不限于酶促方式、氧化取代和螯合。可将修饰用于例如免疫测定标记的连接。经修饰的G1多肽可使用本领域确立的程序制备,并且可使用本领域已知的标准测定筛选,一些分析法在下文和实施例中有所描述。

[0331] 在本发明的一些实施方案中,该抗体包含经修饰的恒定区诸如免疫惰性或部分惰

性的恒定区,例如不触发补体介导的裂解,不刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),或不活化小神经胶质细胞;或以下活性中的任何一者或多者减少(与未经修饰的抗体相比):触发补体介导的裂解、刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或活化小神经胶质细胞。恒定区的不同修饰可用于实现效应功能的最佳水平和/或组合。参见例如Morgan等, *Immunology* 86:319-324 (1995);Lund等, *J. Immunology* 157:4963-9 157:4963-4969 (1996);Idusogie等, *J. Immunology* 164:4178-4184 (2000);Tao等, *J. Immunology* 143:2595-2601 (1989);以及Jefferis等, *Immunological Reviews* 163:59-76 (1998)。在一些实施方案中,该恒定区如Eur. *J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624;PCT专利申请No. PCT/GB99/01441;和/或英国专利申请No. 9809951.8所述修饰。在其它实施方案中,该抗体包含含有以下突变的人重链IgG2恒定区:A330P331至S330S331(氨基酸编号参考野生型IgG2序列)。Eur. *J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624。在其它实施方案中,该恒定区未经N-连接糖基化。在一些实施方案中,该恒定区由于糖基化的氨基酸残基或作为恒定区中N-糖基化识别序列的一部分的侧翼残基的突变而未经N-连接糖基化。例如,N-糖基化位点N297可突变为A、Q、K或H。参见Tao等, *J. Immunology* 143:2595-2601 (1989);以及Jefferis等, *Immunological Reviews* 163:59-76 (1998)。在一些实施方案中,该恒定区是未经N-连接糖基化的。该恒定区可以是由于酶切(诸如通过酶PNGase移除糖),或在糖基化缺陷宿主细胞中表达而未经N-连接糖基化。

[0332] 其它抗体修饰包括如1999年11月18日公开的PCT公布No. WO 99/58572所述经修饰的抗体。除指向靶标分子的结合结构域之外,这些抗体还包含氨基酸序列与人免疫球蛋白重链的恒定结构域的全部或部分基本上同源的效应结构域。这些抗体能够结合靶标分子,而不触发显著的补体依赖性裂解,或细胞介导的靶标破坏。在一些实施方案中,该效应结构域能够特异性结合FcRn和/或Fc γ RIIb。这些通常基于来源于两个或更多个人免疫球蛋白重链C_H2结构域的嵌合结构域。以这种方式经修饰的抗体特别适用于慢性抗体治疗,以避免对常规抗体治疗的炎性和其它不利反应。

[0333] 在一些实施方案中,本发明包括亲和力成熟的实施方案。例如,亲和力成熟的抗体可通过本领域已知的程序制备(Marks等,1992, *Bio/Technology*, 10:779-783;Barbas等,1994, *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813;Schier等,1995, *Gene*, 169:147-155;Yelton等,1995, *J. Immunol.*, 155:1994-2004;Jackson等,1995, *J. Immunol.*, 154(7):3310-9;Hawkins等,1992, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896;以及W02004/058184)。

[0334] 以下方法可用于调整抗体的亲和力以及表征CDR。一种表征抗体的CDR和/或改变(诸如提高)多肽诸如抗体的结合亲和力的方法称为“文库扫描诱变”。一般来讲,文库扫描诱变的工作方式如下。使用本领域已知的方法将CDR中的一个或多个氨基酸位置置换为两个或更多个(诸如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个)氨基酸。这生成小克隆文库(在一些实施方案中,每个分析的氨基酸位置一个克隆),每个文库具有两个或更多个成员的复杂性(如果每个位置有两个或更多个氨基酸取代)。一般来讲,该文库还包括包含天然(未取代)氨基酸的克隆。筛选来自每个文库的少量克隆,例如约20-80个克隆(根据文库的复杂性)对靶标多肽(或其它结合靶标)的结合亲和力,并鉴定结合增加、相同、减少或不结合的候选物。结合亲和力的测定方法是本领域熟知的。结合亲和力可使用Biacore表面等离子共振分析测定,该分析检测约2倍或更大的结合亲和力差异。当起始抗

体已经以相对较高的亲和力,例如约10nM或更小的 K_D 结合时,Biacore是特别有用的。使用Biacore表面等离子共振筛选在本文的实施例中有所描述。

[0335] 结合亲和力可使用Kinexa Biocensor、闪烁迫近测定、ELISA、ORIGEN免疫测定(IGEN)、荧光猝灭、荧光转移和/或酵母展示测定。结合亲和力也可使用合适的生物测定筛选。

[0336] 在一些实施方案中,使用本领域公认的诱变方法(一些方法在本文中有所描述)将CDR中的每个氨基酸位置置换(在一些实施方案中,每次一个)为全部20个天然氨基酸。这生成小克隆文库(在一些实施方案中,每个分析的氨基酸位置一个克隆),每个文库具有20个成员的复杂性(如果每个位置有全部20个氨基酸取代)。

[0337] 在一些实施方案中,待筛选的文库包括两个或更多个位置的取代,它们可在相同的CDR中或在两个或更多个CDR中。因此,该文库可包含一个CDR中两个或更多个位置的取代。该文库可包含两个或更多个CDR中两个或更多个位置的取代。该文库可包含3个、4个、5个或更多个位置的取代,所述位置存在于两个、三个、四个、五个或六个CDR中。该取代可使用低冗余度密码子制备。参见例如Balint等,(1993)Gene 137 (1):109-18)的表2。

[0338] CDR可以是CDRH3和/或CDRL3。CDR可以是CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2和/或CDRH3中的一者或多者。CDR可以是Kabat CDR、Chothia CDR或延伸CDR。

[0339] 可对具有改善的结合的候选物测序,从而鉴定产生改善的亲合力的CDR取代突变体(也称为“改善的”取代)。还可对结合 of 的候选物测序,从而鉴定保持结合的CDR取代。

[0340] 可进行多轮筛选。例如,具有改善的结合的候选物(每个候选物包含一个或多个CDR的一个或多个位置处的氨基酸取代)也用于设计第二文库,该文库包含每个改善的CDR位置(即,取代突变体显示出改善的结合之处的CDR的氨基酸位置)处的至少初始和取代氨基酸。该文库的制备以及筛选或选择在下文进一步讨论。

[0341] 文库扫描诱变还提供了CDR的表征方法,就具有改善的结合的克隆频率而言,结合相同、结合减少或不结合还提供了关于每个氨基酸位置对于抗体-抗原复合物稳定性的重要性的信息。例如,如果CDR的位置在改为全部20个氨基酸时保持结合,则将该位置鉴定为抗原结合的不一定必须的位置。相反,如果CDR的位置仅在小百分比的取代中保持结合,则将该位置鉴定为对CDR功能重要的位置。因此,文库扫描诱变法生成关于可改为多个不同氨基酸(包括全部20个氨基酸)的CDR中的位置,以及不可改变或仅可改为几个氨基酸的CDR中的位置的信息。

[0342] 具有改善的亲合力的候选物可组合成第二文库,该文库包括改善的氨基酸、该位置的初始氨基酸,根据所需的或使用所需的筛选或选择方法所允许的文库的复杂性,还可包括该位置的另外取代。此外,如果需要,邻近的氨基酸位置可随机分为至少两个或更多个氨基酸。邻近氨基酸的随机化可允许突变CDR的另外构象灵活性,继而可允许或有利于引入大量改善突变。该文库还可包含在第一轮筛选中未显示出改善亲和力的位置的取代。

[0343] 使用本领域已知的任何方法在第二文库中筛选或选择具有改善的和/或改变的结合亲和力的文库成员,包括使用Biacore表面等离子共振分析筛选,以及使用本领域已知的任何选择方法选择,所述方法包括噬菌体展示、酵母展示和核糖体展示。

[0344] 在一些实施方案中,本发明还涵盖包含来自本发明的抗体(诸如G1)或多肽的一个或多个片段或区的融合蛋白。在一个实施方案中,提供包含SEQ ID NO:2(图5)示出的可变

轻链区的至少10个连续氨基酸和/或SEQ ID NO:1 (图5) 示出的可变重链区的至少10个氨基酸的融合多肽。在其它实施方案中,提供包含SEQ ID NO:2 (图5) 示出的可变轻链区的至少约10个、至少约15个、至少约20个、至少约25个或至少约30个连续氨基酸和/或SEQ ID NO:1 (图5) 示出的可变重链区的至少约10个、至少约15个、至少约20个、至少约25个或至少约30个连续氨基酸的融合多肽。在另一个实施方案中,该融合多肽包含图5的SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1示出的G1的轻链可变区和/或重链可变区。在另一个实施方案中,该融合多肽包含G1的一个或多个CDR。在其它实施方案中,该融合多肽包含抗体G1的CDR H3和/或CDR L3。就本发明的目的而言,G1融合蛋白包含一个或多个G1抗体以及在天然分子中该抗体未连接的另一个氨基酸序列,例如来自另一个区的异源序列或同源序列。示例性异源序列包括但不限于“标签”,诸如FLAG标签或6His标签 (SEQ ID NO:56)。标签是本领域中熟知的。

[0345] G1融合多肽可通过本领域已知的方法生成,例如合成或重组。通常,本发明的G1融合蛋白通过使用本文所述的重组方法表达编码其的多核苷酸来制备,但也可通过本领域已知的其它方法制备,包括例如化学合成。

[0346] 在一些方面,本发明还提供包含来源于G1的抗体或多肽的组合物,所述G1缀合(例如,连接)到有助于连接到固相载体(诸如生物素或抗生物素蛋白)的试剂。为简洁起见,通常提及关于G1或抗体的以下理解:这些方法适用于本文所述的任何CGRP结合实施方案。缀合通常是指如本文所述连接这些组分。连接(通常为紧密固定这些组分,以便至少用于施用)可以多种方式实现。例如,当试剂和抗体各自具有能够与另一者反应的替代物时,它们之间可直接反应。例如,一者上的亲核基团诸如氨基或巯基基团能够与另一者上的含羰基基团诸如酸酐或酰卤,或与包含良好离去基团(例如,卤化物)的烷基基团反应。

[0347] 抗体或多肽可连接至标记试剂(或者称为“标记”),诸如荧光分子、放射性分子或本领域已知的任何其它标记。标记是本领域已知的,它们通常(直接或间接)提供信号。

[0348] 在一些实施方案中,本发明还提供包含抗体G1和/或本文所述的任何或所有抗体或多肽的组合物(包括药物组合物)和试剂盒。

[0349] 在一些实施方案中,本发明还提供编码本发明的抗体和多肽(包括包含图5示出的轻链和重链可变区的多肽序列的抗体)的分离的多核苷酸,以及包含该多核苷酸的载体和宿主细胞。

[0350] 在一些实施方案中,本发明提供多核苷酸(或组合物,包括药物组合物),其包括编码任何以下项的多核苷酸:(a) 表6示出的抗体G1或其变体;(b) 表6示出的抗体G1或其变体的片段或区;(c) 表6示出的抗体G1或其变体的轻链;(d) 表6示出的抗体G1或其变体的重链;(e) 表6示出的抗体G1或其变体的轻链和/或重链的一个或多个可变区;(f) 表6示出的抗体G1或其变体的一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR);(g) 抗体G1的重链的CDR H3;(h) 表6示出的抗体G1或其变体的轻链的CDR L3;(i) 表6示出的抗体G1或其变体的轻链的三个CDR;(j) 表6示出的抗体G1或其变体的重链的三个CDR;(k) 表6示出的抗体G1或其变体的轻链的三个CDR和重链的三个CDR;以及(l) 包含(b)至(k)中的任一者的抗体。在一些实施方案中,该多核苷酸包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10示出的任何一种或两种多核苷酸。

[0351] 在另一个方面,本发明提供编码本文所述的任何抗体(包括抗体片段)和多肽,诸如具有受损的效应功能的抗体和多肽的多核苷酸。多核苷酸可通过本领域已知的程序制

备。

[0352] 在另一个方面,本发明提供包含本发明的任何多核苷酸的组合物(诸如药物组合物)。在一些实施方案中,该组合物包含含有编码本文所述的G1抗体的多核苷酸的表达载体。在其它实施方案中,该组合物包含含有编码本文所述的任何抗体或多肽的多核苷酸的表达载体。在其它实施方案中,该组合物包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10示出的任何一种或两种多核苷酸。本文还描述了表达载体,以及多核苷酸组合物的施用。

[0353] 在另一个方面,本发明提供制备本文所述的任何多核苷酸的方法。

[0354] 本发明还涵盖与任何此类序列互补的多核苷酸。多核苷酸可以是单链的(编码或反义)或双链的,并且可以是DNA(基因组、cDNA或合成)或RNA分子。RNA分子包括HnRNA分子(其包含内含子并且以一对一的方式对应DNA分子),以及mRNA分子(其不包含内含子)。另外的编码或非编码序列可以但不必存在于本发明的多核苷酸内,并且多核苷酸可以但不必连接至其它分子和/或载体材料。

[0355] 多核苷酸可包含天然序列(即,编码抗体或其部分的内源序列)或可包含此类序列的变体。多核苷酸变体包含一个或多个取代、添加、缺失和/或插入,使得编码多肽的免疫反应性相对于天然免疫反应性分子不减少。通常如本文所述评估对编码多肽的免疫反应性的影响。变体优选地表现出与编码天然抗体或其部分的多核苷酸序列的至少约70%相同性,更优选地至少约80%相同性,以及最优选地至少约90%相同性。

[0356] 如下文所述,如果两个序列对齐以实现最大对应性时,这两个序列中的核苷酸或氨基酸序列相同,则两个多核苷酸或多肽序列被认为具有“相同性”。两个序列之间的比较通常通过在比较窗口上比较序列,以鉴定和比较序列相似性的局部区域进行。如本文所用,“比较窗口”是指至少约20个连续位置、通常30个至约75个、40个至约50个连续位置的区段,其中在两个序列最佳对齐后,序列可与相同数量连续位置的参考序列比较。

[0357] 用于比较的序列的最佳对齐可使用Lasergene生物信息学软件包(DNASTAR, Inc., Madison, WI)中的Megalign程序使用默认参数进行。该程序包括多个比对方案,描述于以下参考文献中:Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships. 载于Dayhoff, M.O. (编) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC, 第5卷, 增刊3, 第345-358页; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenies, 第626-645页, Methods in Enzymology, 第183卷, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. 和 Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. 和 Muller W., 1988, CABIOS4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. 和 Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. 和 Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730。

[0358] 优选地,“序列相同性的百分比”通过在至少20个位置的比较窗口上比较两个最佳对齐序列确定,其中对于两个序列的最佳对齐,与参考序列(不包含添加或缺失)相比,比较窗口中多核苷酸或多肽序列的一部分可包含20%或更少、通常5%至15%、或10%至12%的添加或缺失(即空位)。百分比通过如下方法计算:确定两个序列中存在的相同核酸碱基或

氨基酸残基的位置数,得到匹配位置数;用匹配位置数除以参考序列中的位置总数(即窗口大小);并将结果乘以100得到序列相同性的百分比。

[0359] 变体也可以或者基本上与天然基因或它们的一部分或互补序列同源。此类多核苷酸变体能够在中度严格条件下与编码天然抗体的天然存在的DNA序列(或互补序列)杂交。

[0360] 合适的“中度严格条件”包括在 $5\times$ SSC、0.5%SDS、1.0mM EDTA (pH8.0)的溶液中预洗涤;在 50°C - 65°C 下, $5\times$ SSC杂交过夜;然后在 65°C 下使用包含0.1%SDS的 $2\times$ 、 $0.5\times$ 和 $0.2\times$ SSC洗涤20分钟两次。

[0361] 如本文所用,“高度严格条件”或“高严格性条件”为:(1)采用低离子强度和高温洗涤,例如在 50°C 下0.015M氯化钠/0.0015M柠檬酸钠/0.1%十二烷基磺酸钠;(2)在杂交期间采用变性剂,诸如甲酰胺,例如在 42°C 下含0.1%牛血清白蛋白/0.1%Ficoll/0.1%聚乙烯吡咯烷酮/50mM磷酸钠缓冲液pH6.5以及750mM氯化钠、75mM柠檬酸钠的50%(v/v)甲酰胺;或(3)在 42°C 下采用50%甲酰胺、 $5\times$ SSC(0.75M NaCl、0.075M柠檬酸钠)、50mM磷酸钠(pH6.8)、0.1%焦磷酸钠、 $5\times$ Denhardt溶液、超声鲑精DNA(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、0.1%SDS和10%硫酸葡聚糖,在 42°C 下 $0.2\times$ SSC(氯化钠/柠檬酸钠)中和 55°C 下50%甲酰胺中洗涤,然后在 55°C 下包含EDTA的 $0.1\times$ SSC中进行高严格性洗涤。技术人员将了解如何根据需要进行调整温度、离子强度等,以适应诸如探针长度等的因素。

[0362] 本领域的普通技术人员将认识到,由于遗传密码简并性,存在多个编码本文所述的多肽的核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列具有最小同源性。然而,本发明特别设想了由于密码子使用差异而造成的多核苷酸变化。另外,包含本文提供的多核苷酸序列的等位基因在本发明的范围内。等位基因是由于核苷酸的一个或多个突变,诸如缺失、添加和/或取代而改变的内源性基因。所得的mRNA和蛋白质可以但不必具有改变的结构或功能。可使用标准技术(诸如杂交、扩增和/或数据库序列比较)鉴定等位基因。

[0363] 本发明的多核苷酸可使用化学合成、重组方法或PCR获得。化学多核苷酸合成法是本领域熟知的,不必在本文中详细描述。本领域的技术人员可使用本文提供的序列和商业DNA合成仪制备所需的DNA序列。

[0364] 对于使用重组方法制备多核苷酸,可将包含所需序列的多核苷酸插入合适的载体,继而可将载体引入合适的宿主细胞,进行复制和扩增,如本文进一步讨论。多核苷酸可通过本领域已知的任何方法插入宿主细胞。通过直接摄入、胞吞、转染、F-交配或电穿孔引入外源性多核苷酸来转化细胞。一旦引入,外源性多核苷酸即可以非整合载体(诸如质粒)维持在细胞内,或整合进宿主细胞基因组。这样扩增的多核苷酸可通过本领域熟知的方法从宿主细胞分离。参见例如,Sambrook等(1989)。

[0365] 或者,PCR允许DNA序列复制。PCR技术是本领域熟知的,并且在美国专利No.4,683,195、4,800,159、4,754,065和4,683,202,以及PCR:The Polymerase Chain Reaction, Mullis等编,Birkhauser Press,Boston(1994)中有所描述。

[0366] RNA可通过如下方法获得:使用适当载体中的分离DNA,并将其插入合适的宿主细胞。当细胞复制且DNA转录为RNA时,可使用本领域技术人员熟知的方法分离RNA,如例如Sambrook等,(1989)所示。

[0367] 合适的克隆载体可根据标准技术构建,或可选自本领域可用的多种克隆载体。虽

然所选的克隆载体可根据预期使用的宿主细胞而变化,但可用的克隆载体通常具有自我复制能力,可具有特定限制性核酸内切酶的单个靶标,和/或可携带可用于选择包含载体的克隆的标记基因。合适的实例包括质粒和细菌病毒例如pUC18、pUC19、Bluescript (例如,pBS SK+) 及其衍生物mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体DNA和穿梭载体诸如pSA3和pAT28。这些和多种其它克隆载体可从商业供应商诸如BioRad、Stratagene和Invitrogen获得。

[0368] 表达载体通常是可复制的多核苷酸构建体,其包含根据本发明的各方面中的任一者的多核苷酸。这意味着,表达载体必须能够以附加体或以染色体DNA的整体部分在宿主细胞中复制。合适的表达载体包括但不限于质粒、病毒载体,包括腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、粘粒以及PCT公布No. WO 87/04462公开的表达载体。载体组分通常可包括但不限于以下一种或多种:信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、合适的转录控制元件(诸如启动子、增强子和终止子)。对于表达(即,翻译),通常还需要一个或多个翻译控制元件,诸如核糖体结合位点、翻译起始位点和终止密码子。

[0369] 包含所关注的多核苷酸的载体可通过任何多种适当方法,包括电穿孔;利用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其它物质的转染;微粒轰击;脂质体转染;以及感染(例如,其中载体是感染试剂,诸如牛痘病毒)引入宿主细胞。引入载体或多核苷酸的选择通常取决于宿主细胞的特征。

[0370] 在一些方面,本发明还提供包含本文所述的任何多核苷酸的宿主细胞。任何能够过表达异源DNA的宿主细胞均可用于分离编码所关注的抗体、多肽或蛋白质的基因。哺乳动物宿主细胞的非限制性实例包括但不限于COS、HeLa和CHO细胞。还可参见PCT公布No. WO 87/04462。合适的非哺乳动物宿主细胞包括原核生物(诸如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*))和酵母(诸如酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、裂殖酵母(*S. pombe*);或乳酸克鲁维酵母(*K. lactis*))。优选地,宿主细胞的cDNA表达水平是宿主细胞中对应的所关注的内源性抗体或蛋白质(如果存在)的约5倍、更优选地10倍、甚至更优选地20倍。筛选特异性结合A1-40的宿主细胞通过免疫测定或FACS实现。可鉴定过表达所关注的抗体或蛋白质的细胞。

[0371] D. 组合物

[0372] 在一些实施方案中,用于本发明的方法的组合物包含有效量的本文所述的抗体(例如,抗CGRP拮抗剂抗体、调节CGRP途径的单克隆抗体)或抗体来源多肽。此类组合物以及如何配制的实施例在前述部分和下文也有所描述。在一个实施方案中,该组合物还包含CGRP拮抗剂。在一些实施方案中,该组合物包含一种或多种调节CGRP途径的单克隆抗体。在一些实施方案中,该组合物包含一种或多种抗CGRP拮抗剂抗体。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体识别人CGRP。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体是人源化的。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体包含不触发不期望或不希望的免疫应答诸如抗体介导的裂解或ADCC的恒定区。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体包含抗体G1的一个或多个CDR(诸如G1的一个、两个、三个、四个、五个,或在一些实施方案中,全部六个CDR)。在一些实施方案中,该抗CGRP拮抗剂抗体是人的。

[0373] 应当理解,该组合物可包含超过一个抗体(例如,超过一个抗CGRP拮抗剂抗体--识别CGRP的不同表位的抗CGRP拮抗剂抗体的混合物)。其它示例性组合物包含超过一个识别相同表位的抗CGRP拮抗剂抗体,或结合CGRP的不同表位的抗CGRP拮抗剂抗体的不同物质。

[0374] 组合物还可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, 第20版, (2000) Lippincott Williams和Wilkins编, K.E.Hoover)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用的剂量和浓度下对受者是无毒的。抗体的治疗性制剂可包含一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂, 其中这些物质的非限制性实例包括缓冲剂, 诸如磷酸、柠檬酸和其它有机酸; 盐, 诸如氯化钠; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂 (诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 氯己双铵; 苯扎氯铵、苄索氯铵; 酚、丁醇或苄醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 儿茶酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量 (小于约10个残基) 多肽; 蛋白质, 诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 诸如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸 (例如, 浓度为0.1mM至100mM、0.1mM至1mM、0.01mM至50mM、1mM至50mM、1mM至30mM、1mM至20mM、10mM至25mM), 诸如甘氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、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、甘露糖或糊精; 螯合剂 (例如, 浓度为0.001mg/mL至1mg/mL、0.001mg/mL至1mg/mL、0.001mg/mL至0.1mg/mL、0.001mg/mL至0.01mg/mL), 诸如EDTA (例如, 乙二胺四乙酸二钠二水合物); 糖 (例如, 浓度为1mg/mL至500mg/mL、10mg/mL至200mg/mL、10mg/mL至100mg/mL、50mg/mL至150mg/mL), 诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇; 成盐抗衡离子, 诸如钠; 金属络合物 (例如, 锌-蛋白质络合物); 和/或非离子表面活性剂 (例如, 浓度为0.01mg/mL至10mg/mL、0.01mg/mL至1mg/mL、0.1mg/mL至1mg/mL、0.01mg/mL至0.5mg/mL) 诸如, TWEENTM (例如, 聚山梨酸酯 (例如, 聚山梨酸酯20、聚山梨酸酯40、聚山梨酸酯60、聚山梨酸酯80))、PLURONICSTM或聚乙二醇 (PEG)。本文还描述了药学上可接受的赋形剂。

[0375] 抗体 (例如, 抗CGRP拮抗剂抗体) 及其组合物也可与起到增强和/或补充该试剂的有效性作用的其它试剂联合使用。

[0376] E. 试剂盒

[0377] 在一个方面, 本发明还提供用于本发明方法的试剂盒。试剂盒可包括一个或多个容器, 其包含本文所述的抗体 (例如, 抗CGRP拮抗剂抗体 (诸如人源化抗体)) 或本文所述的多肽, 以及根据本文所述的任何方法的使用说明。一般来讲, 这些说明包括根据本文所述的任何方法施用抗体, 以治疗、改善或预防头痛 (诸如偏头痛) 的描述。该试剂盒还可包括选择适于治疗的个体的描述, 该选择基于鉴定该个体是否患有头痛, 或该个体是否具有患上头痛的风险。在其它实施方案中, 该说明包括将抗体 (例如, 抗CGRP拮抗剂抗体) 施用于处于患上头痛 (诸如偏头痛) 的风险的个体的描述。

[0378] 在一些实施方案中, 该抗体是人源化抗体。在一些实施方案中, 该抗体是人的。在其它实施方案中, 该抗体是单克隆抗体。在其它实施方案中, 该抗体包含抗体G1的一个或多个CDR (诸如G1的一个、两个、三个、四个、五个, 或在一些实施方案中, 全部六个CDR)。

[0379] 关于抗体 (例如, 抗CGRP拮抗剂抗体) 的使用说明通常包括关于预期治疗的剂量、给药计划和施用途径的信息。该容器可以是单位剂量、批量包装 (例如, 多剂量包装) 或亚单位剂量。试剂盒中提供的说明通常是标签或说明书上的书面说明 (例如, 试剂盒中包括的纸张), 但机器可读的说明 (例如, 载于存储磁盘或光盘上的说明) 也是可接受的。

[0380] 标签或说明指示, 组合物可用于治疗、改善和/或预防头痛 (诸如偏头痛)。可提供

说明用于实践本文所述的任何方法。

[0381] 本发明的试剂盒具有合适的包装。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶、广口瓶、软包装(例如,密封聚酯薄膜(sealed Mylar)或塑料袋)等等。还设想了与特定设备诸如吸入器、鼻腔施用设备(例如,喷雾器)或输注设备诸如微型泵联合使用的包装。试剂盒可具有无菌入口(例如容器可以是具有塞子的静脉输液袋或瓶,该塞子可被皮下注射针刺穿)。该容器也可具有无菌入口(例如容器可以是具有塞子的静脉输液袋或瓶,该塞子可被皮下注射针刺穿)。组合物中的至少一种活性剂是抗CGRP拮抗剂抗体和/或调节CGRP途径的单克隆抗体。该容器还可包含第二药物活性剂。

[0382] 试剂盒可任选地提供另外的组件,诸如缓冲液和解释性信息。通常,该试剂盒包括容器以及容器上或与容器相关的标签或说明书。

[0383] 提供以下实施例,以说明但不是限制本发明。

[0384] 实施例

[0385] 实施例1:针对CGRP的单克隆抗体的生成和表征

[0386] 抗CGRP抗体的生成。为生成具有大鼠和人CGRP的跨物种反应性的抗CGRP抗体,以不同间隔使用25-100 μ g于佐剂中缀合到KLH的人 α -CGRP或 β -CGRP免疫小鼠(每个足垫50 μ l,每只小鼠总共100 μ l)。免疫通常如Geerligs HJ等,1989,J.Immunol.Methods 124:95-102; Kenney JS等,1989,J.Immunol.Methods 121:157-166;以及Wicher K等,1989,Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.89:128-135所述进行。使用50 μ g于CFA(完全Freund佐剂)中缀合到KLH的人 α -CGRP或 β -CGRP第一次免疫小鼠。在21天后,使用25 μ g于IFA(不完全Freund佐剂)中缀合到KLH的人 β -CGRP(对于第一次免疫使用人 α -CGRP的小鼠)或 α -CGRP(对于第一次免疫使用人 β -CGRP的小鼠)第二次免疫小鼠。在第二次免疫后二十三天,使用25 μ g于IFA中缀合到KLH的大鼠 α -CGRP进行第三次免疫。在十天后,使用ELISA测试抗体滴度。在第三次免疫后34天,使用25 μ g于IFA中的肽(大鼠 α -CGRP-KLH)进行第四次免疫。在第四次免疫后32天,使用100 μ g可溶性肽(大鼠 α -CGRP)进行最后加强。

[0387] 从免疫小鼠获得脾细胞,并使用聚乙二醇1500将其以10:1的比率与NS0骨髓瘤细胞融合。使杂交体于包含20%马血清和2-草酰乙酸/丙酮酸/胰岛素(Sigma)的DMEM中接种于96孔板中,开始次黄嘌呤/氨基蝶呤/胸苷筛选。在第8天,向所有的孔加入100 μ l包含20%马血清的DMEM。使用抗体捕获免疫测定筛选杂交体的上清液。使用类别特异性二抗确定抗体类别。

[0388] 根据与人和大鼠CGRP结合选择一组单克隆抗体产生细胞系供进一步表征。这些抗体和特征如下表2和3所示。

[0389] 纯化和Fab片段制备。使用蛋白A亲和色谱法从杂交瘤培养物上清液纯化供进一步表征选择的单克隆抗体。将上清液平衡至pH8。然后将上清液加载到用PBS平衡至pH8的蛋白A柱MabSelect(Amersham Biosciences#17-5199-02)。用5个柱体积的PBS(pH8)洗涤柱。用50mM柠檬酸-磷酸缓冲液(pH3)洗脱抗体。用1M磷酸缓冲液(pH8)中和洗脱的抗体。用PBS(pH7.4)透析纯化的抗体。使用鼠单克隆抗体标准曲线通过SDS-PAGE测定抗体浓度。

[0390] 使用Immunopure Fab试剂盒(Pierce#44885)通过木瓜蛋白酶酶解全抗体制备Fab,并且按照制造商的说明通过流经蛋白A色谱纯化。使用已知浓度(通过氨基酸分析测定)的标准Fab通过ELISA和/或SDS-PAGE电泳测定浓度,并使用10D=0.6mg/ml通过A280确

定(或根据氨基酸序列测定理论当量)。

[0391] Fab的亲和力测定。使用Biacore3000TM表面等离子共振 (SPR) 系统 (Biacore, INC, Piscataway NJ) 以及制造商自有的运行缓冲液HBS-EP (10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005%v/v聚山梨酸酯P20) 在25℃或37℃下测定抗CGRP单克隆抗体的亲和力。亲和力通过如下方式测定:通过SA芯片上的预固定链霉亲和素捕获N-末端生物素化CGRP肽(从GenScript Corporation, New Jersey或Global Peptide Services, Colorado定制), 并测定整个CGRP表面上滴定的抗体Fab的结合动力学。将生物素化CGRP稀释为HBS-EP, 并以小于0.001mg/ml的浓度注射到芯片上。在单个芯片通道上使用可变流动时间, 实现两个抗原密度范围:<50个应答单位 (RU) 用于详细动力学研究, 约800RU用于浓度研究和筛选。将两倍或三倍系列稀释(通常浓度范围1μM-0.1nM(目标是0.1-10×估计 K_D))的纯化Fab片段以100 μL/min注射1分钟, 然后进行解离10分钟的时间。在每个结合循环后, 使用于25%v/v乙醇中的25mM NaOH再生表面, 该表面可耐受超过几百次循环。动力学缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})使用BIAevaluation程序, 通过将数据拟合为1:1Langmuir结合模型来同时获得(Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6.99-110)。从比率 $K_D = k_{off}/k_{on}$ 计算全局平衡解离常数(K_D)或“亲和力”。鼠Fab片段的亲和力如表2和3所示。

[0392] 鼠抗CGRP抗体的表位作图。为确定抗CGRP抗体结合人α-CGRP的表位, 如上文所述通过将N-末端生物素化CGRP片段氨基酸19-37和氨基酸25-37捕获于SA传感器芯片上来测定Fab片段与各种CGRP片段的结合亲和力。图1示出了在25℃下测定的结合亲和力。如图1所示, 除抗体4901之外, 所有抗体均结合到人α-CGRP片段19-37和25-37, 亲和力类似于它们与全长人α-CGRP (1-37) 的结合亲和力。抗体4901结合到人α-CGRP片段25-37, 亲和力比结合到全长人α-CGRP片段低六倍, 主要是由于解离速率降低。数据表明, 这些抗CGRP抗体通常结合到CGRP的C末端。

[0393] 进行丙氨酸扫描, 以进一步表征涉及抗CGRP抗体结合的人α-CGRP中的氨基酸。通过肽合成生成具有单个丙氨酸取代的不同人α-CGRP变体。它们以及用于Biacore分析的所有其它肽的氨基酸序列如表4所示。使用上述Biacore测定抗CGRP抗体的Fab片段与这些变体的亲和力。如图1所示, 全部12个抗体靶向C末端表位, 其中氨基酸F37是最关键的残基。F37突变为丙氨酸显著降低了亲和力, 甚至完全敲除了抗CGRP抗体与肽的结合。其次重要的氨基酸残基是G33, 然而, 在这个位置只有高亲和力抗体 (7E9、8B6、10A8和7D11) 受到丙氨酸置换的影响。氨基酸残基S34也在这四个高亲和力抗体的结合中发挥显著作用, 但作用较小。

[0394] 表2. 抗CGRP单克隆抗体与人α-CGRP结合的特征及其拮抗剂活性

[0395]

抗体	在 25℃ 下与人 α -CGRP 结合的 K_D (nM)	在 37℃ 下与人 α -CGRP 结合的 K_D (nM)	在 25℃ 下基于细胞的人 α -CGRP 与其受体结合的阻断(通过 cAMP 活化测量)	在 25℃(室温)下通过放射性配体结合测定而测量的 IC_{50} (nM 结合位点)。
7E9	1.0	0.9	是	2.5
8B6	1.1	1.2	是	4.0
10A8	2.1	3.0	是	n.d.
7D11	4.4	5.4	是	n.d.
6H2	9.3	42	是	12.9
4901	61	139	是	58
14E10	80	179	是	n.d.
9B8	85	183	否	n.d.
13C2	94	379	否	n.d.
14A9	148	581	否	n.d.
6D5	210	647	否	n.d.
1C5	296	652	否	n.d.

[0396] 注:抗体4901可商购获得(Sigma,产品号C7113)。

[0397] n.d.=未测定

[0398] 表3.抗CGRP单克隆抗体与大鼠 α -CGRP结合的特征以及拮抗剂活性

[0399]

抗体	在 37℃ 下与大鼠 α -CGRP 结合的 K_D (nM)	在 25℃ 下基于细胞的大鼠 α -CGRP 与其受体结合的阻断(通过 cAMP 活化测定)	隐神经测定中的体内阻断
4901	3.4	是	是
7E9	47	是	是
6H2	54	否	否
8B6	75	是	是

[0400]

7D11	218	是	是
10A8	451	否	n.d.
9B8	876	否	n.d.
14E10	922	否	n.d.
13C2	>1000	否	n.d.
14A9	>1000	否	n.d.
6D5	>1000	否	n.d.
1C5	>1000	否	n.d.

[0401] “n.d.”表示未对抗体进行测试。

[0402] 表4.人 α -CGRP片段(SEQ ID NO:15-40)和相关肽(SEQ ID NO:41-47)的氨基酸序列。除SEQ ID NO:36-40之外,所有肽均为C末端酰胺化的。粗体残基表示点突变。

[0403]

CGRP	氨基酸序列	SEQ ID NO
1-37 (WT)	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGSKAF	15
8-37	VTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGSKAF	16
19-37	SGGVVKNNFVPTNVGSKAF	17
P29A (19-37)	SGGVVKNNFVATNVGSKAF	18
K35A (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSAAF	19
K35E (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSEAF	20
K35M (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSMFAF	21
K35Q (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSQAF	22
F37A (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSKAA	23
25-38A	NNFVPTNVGSKAFA	24
25-37	NNFVPTNVGSKAF	25
F27A (25-37)	NNAVPTNVGSKAF	26
V28A (25-37)	NNFAPTNVGSKAF	27
P29A (25-37)	NNFVATNVGSKAF	28
T30A (25-37)	NNFVPANVGSKAF	29
N31A (25-37)	NNFVPTAVGSKAF	30
V32A (25-37)	NNFVPTNAGSKAF	31
G33A (25-37)	NNFVPTNVASKAF	32
S34A (25-37)	NNFVPTNVGAKAF	33
F37A (25-37)	NNFVPTNVGSKAA	34
26-37	NFVPTNVGSKAF	35
19-37-COOH	SGGVVKNNFVPTNVGSKAF	36
19-36-COOH	SGGVVKNNFVPTNVGSKA	37
1-36-COOH	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGSKA	38
1-19-COOH	ACDTATCVTHRLAGLLSRS	39
1-13-COOH	ACDTATCVTHRLA	40
大鼠 α (1-37)	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSEAF	41
大鼠 α (19-37)	SGGVVKDNFVPTNVGSEAF	42
人 β (1-37)	ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKSNFVPTNVGSKAF	43
大鼠 β (1-37)	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSKAF	44
人降钙素(1-32)	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	45
人糊精(1-37)	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	46
人肾上腺髓质素(1-52)	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDK DKDNVAPRSKISPQGY	47

[0404] 实施例2:使用体外测定筛选抗CGRP拮抗剂抗体。

[0405] 使用基于细胞的cAMP活化测定和结合测定在体外进一步筛选鼠抗CGRP抗体的拮抗剂活性。

[0406] 通过cAMP测定来测量拮抗剂活性。在存在或不存在抗CGRP抗体(最终浓度1-3000nM)的情况下,将五微升人或大鼠 α -CGRP(最终浓度50nM),或大鼠 α -CGRP或人 α -CGRP(最终浓度0.1nM-10 μ M;作为c-AMP活化的阳性对照)分配到384孔板(Nunc,目录No.264657)中。将十微升于刺激缓冲液(20mM HEPES pH7.4、146mM NaCl、5mM KCl、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂和500 μ M 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx))中的细胞(如果使用人 α -CGRP,则为人SK-N-MC,或如果使用大鼠 α -CGRP,则为来自ATCC的大鼠L6)加入板的孔中。在室温下温育平板30min。

[0407] 在温育后,使用HitHunterTM Enzyme Fragment Complementation Assay (Applied Biosystems)按照制造商的说明进行cAMP活化。该测定基于遗传工程化的 β -半乳糖苷酶,该酶由两个片段即酶受体(EA)和酶供体(ED)构成。当两个片段分离时,酶是失活的。当该片段在一起时,它们可通过称为互补的过程自发重组形成活性酶。EFC测定平台利用ED-cAMP肽缀合物,其中cAMP被抗cAMP识别。该ED片段能够与EA再缔合形成活性酶。在该测定中,抗

cAMP抗体最佳地滴定为结合ED-cAMP缀合物以及抑制酶形成。细胞裂解物样品中cAMP的水平与ED-cAMP缀合物竞争与抗cAMP抗体的结合。测定中游离的ED缀合物的量与cAMP的浓度成比例。因此,cAMP通过活性酶的形成测量,该形成通过-半乳糖苷酶发光底物的转换定量。cAMP活化测定通过添加10 μ l裂解缓冲液和抗cAMP抗体(1:1比率),然后在室温下温育60min进行。然后将10 μ l ED-cAMP试剂加入每个孔,并在室温下温育60分钟。在温育后,将20 μ l EA试剂和CL混合物(包含底物)(1:1比率)加入每个孔,在室温下温育1-3小时或过夜。在PMT仪器上以1秒/孔或在成像仪上以30秒/位置读取平板。在上表2和3中鉴定通过 α -CGRP抑制cAMP活化的抗体(以“是”表示)。表2和3中的数据表明,在该测定中显示出拮抗剂活性的抗体通常具有高亲和力。例如,在该测定中,具有对人 α -CGRP的约80nM或更小的 K_D (在25 $^{\circ}$ C下测定)或具有对大鼠 α -CGRP的约47nM或更小的 K_D (在37 $^{\circ}$ C下测定)的抗体显示出拮抗剂活性。

[0408] 放射性配体结合测定。如上文所述,进行结合测定以测量抗CGRP抗体阻断CGRP结合到受体的 IC_{50} 。Zimmermann等,Peptides 16:421-4,1995;Mallee等,J.Biol.Chem.277:14294-8,2002。将SK-N-MC细胞的膜(25 μ g)在包含10pM 125 I-人 α -CGRP的温育缓冲液(50mM Tris-HCL pH7.4,5mM $MgCl_2$,0.1%BSA)(总体积1mL)中室温下温育90min。为确定抑制浓度(IC_{50}),将来自高约100倍的储液的抗体或未标记的CGRP(作为对照)以各种浓度溶解于温育缓冲液中,并且与膜和10pM 125 I-人 α -CGRP同时温育。通过玻璃微纤维滤纸(GF/B,1 μ m)过滤终止温育,已使用0.5%聚乙烯亚胺封闭滤纸。绘制剂量响应曲线并使用公式: $K_i = IC_{50} / (1 + (配体/K_D))$ 确定 K_i 值;其中SK-N-MC细胞中存在的人 α -CGRP与CGRP1受体的平衡解离常数 $K_D = 8$ pM,并且 $B_{max} = 0.025$ pmol/mg蛋白质。将报告的 IC_{50} 值(就IgG分子而言)转换为结合位点(将其乘以2),以使其可与Biacore确定的亲和力(K_D)(参见表2)比较。

[0409] 表2示出了鼠抗体7E9、8B6、6H2和4901的 IC_{50} 。数据显示,抗体亲和力通常与 IC_{50} 相关:在放射性配体结合测定中,具有较高亲和力(较小的 K_D 值)的抗体具有较小的 IC_{50} 。

[0410] 实施例3:抗CGRP拮抗剂抗体对刺激大鼠隐神经导致的皮肤血管舒张的影响

[0411] 为测试抗CGRP抗体的拮抗剂活性,使用前述大鼠模型测试抗体对刺激大鼠隐神经引起的皮肤血管舒张的影响。Escott等,Br.J.Pharmacol.110:772-776,1993。在该大鼠模型中,隐神经的电刺激诱导CGRP从神经末梢释放,导致皮肤血流量增加。在隐神经刺激后测量雄性Sprague Dawley大鼠(170-300g,得自Charles River Hollister)足底皮肤的血流量。用2%异氟烷使大鼠维持于麻醉状态。由于隐神经的交感神经纤维的伴随刺激,在实验开始时给予甲苯磺酸溴苄铵(30mg/kg,静脉内施用),以使血管收缩最小化。使用恒温连接至温控加热板的直肠探头将体温维持在37 $^{\circ}$ C。通过右股静脉静脉内给予包括抗体、阳性对照(CGRP 8-37)和媒介物(PBS,0.01%Tween 20)的化合物,除图3所示的实验之外,通过尾静脉注射测试化合物和对照,对于图2A和2B所示的实验,腹膜内注射(IP)抗体4901和7D11。阳性对照化合物CGRP 8-37(血管舒张拮抗剂),由于半衰期较短,在神经刺激前3-5min以400nmol/kg(200 μ l)给予。Tan等,Clin.Sci.89:656-73,1995。抗体以不同的剂量给予(1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg和25mg/kg)。

[0412] 对于图2A和2B所示的实验,在电脉冲刺激前72小时腹膜内施用(IP)抗体4901(25mg/kg)、抗体7D11(25mg/kg)或媒介物对照(含0.01%Tween 20的PBS)。对于图3所示的实验,在电脉冲刺激前24小时静脉内施用抗体4901(1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg或25mg/kg)

或媒介物对照(含0.01%Tween20的PBS)。在抗体或媒介物对照施用后,手术暴露右后肢的隐神经,在近侧剖切并用塑料包裹物覆盖以防止干燥。激光多普勒探头置于后爪皮肤的中部背侧上,这是隐神经支配的区域。皮肤血流量以血细胞通量测量,使用激光多普勒流量计对其进行监测。当稳定基线通量(变化小于5%)建立至少5min时,将神经置于铂双极电极上,用60次脉冲(2Hz、10V、1ms、达30秒)进行电刺激,然后20分钟后重复刺激。对于电脉冲刺激的每次通量响应,皮肤血流量的累积变化通过通量-时间曲线下面积(AUC,等于通量变化乘以时间变化)估计。取两次刺激的血流响应平均值。使动物维持于麻醉状态一至三小时的时间期。

[0413] 如图2A和图2B所示,与对照相比,通过电脉冲施加于隐神经刺激的血流量增加通过CGRP8-37(400nmol/kg,静脉内施用)、抗体4901(25mg/kg,腹膜内施用)或抗体7D11(25mg/kg,腹膜内施用)的存在抑制。CGRP 8-37在隐神经刺激前3-5min施用;并且抗体在隐神经刺激前72小时施用。如图3所示,电脉冲施加于隐神经刺激的血流量增加受到在隐神经刺激前24h静脉内施用的不同剂量(1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg和25mg/kg)的抗体4901存在的抑制。

[0414] 对于图4A和4B所示的实验,在抗体施用前手术暴露隐神经。手术暴露右后肢的隐神经,在近侧剖切并用塑料包裹物覆盖以防止干燥。激光多普勒探头置于后爪皮肤的中部背侧上,这是隐神经支配的区域。皮肤血流量以血细胞通量测量,使用激光多普勒流量计对其进行监测。在甲苯磺酸溴苄铵注射后三十至四十五分钟,当稳定基线通量(变化小于5%)建立至少5min时,将神经置于铂双极电极上,并进行电刺激(2Hz、10V、1ms、持续30秒),20分钟后重复刺激。将这两次刺激的血流通量响应平均值用于建立电刺激的基线响应(时间0)。然后静脉内施用(i.v.)抗体4901(1mg/kg或10mg/kg)、抗体7E9(10mg/kg)、抗体8B6(10mg/kg)或媒介物(含0.01%Tween 20的PBS)。随后在抗体或媒介物施用后30min、60min、90min和120min刺激(2Hz、10V、1ms、达30秒)神经。使动物维持于麻醉状态大约三小时的时段。对于电脉冲刺激的每次通量响应,皮肤血流量的累积变化通过通量-时间曲线下面积(AUC,等于通量变化乘以时间变化)估计。

[0415] 如图4A所示,当在抗体施用后60min、90min和120min施加电脉冲刺激时,电脉冲施加于隐神经刺激的血流量增加受到静脉内施用1mg/kg的抗体4901存在的显著抑制,当在抗体施用后30min、60min、90min和120min施加电脉冲刺激时,电脉冲施加于隐神经刺激的血流量增加受到静脉内施用10mg/kg抗体4901存在的显著抑制。图4B示出,当在抗体施用后30min、60min、90min和120min施加电脉冲刺激时,电脉冲施加于隐神经刺激的血流量增加受到抗体7E9(10mg/kg,静脉内施用)存在的显著抑制,当在抗体施用后30min施加电脉冲刺激时,受到抗体8B6(10mg/kg,静脉内施用)存在的显著抑制。

[0416] 这些数据表明,抗体4901、7E9、7D11和8B6可有效用于阻断CGRP活性,该活性通过刺激大鼠隐神经导致的皮肤血管舒张测量。

[0417] 实施例4. 抗CGRP抗体G1及其变体的表征

[0418] 抗CGRP抗体G1的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列如图5所示。将以下方法用于抗体G1及其变体的表达和表征。

[0419] 使用的表达载体。抗体的Fab片段的表达在IPTG诱导型lacZ启动子的控制下,类似于Barbas(2001)Phage display:a laboratory manual,Cold Spring Harbor,NY,Cold

Spring Harbor Laboratory Press pg.2.10。载体pComb3X)所述,然而,修饰包括以下另外的结构域的添加和表达:IgG2人免疫球蛋白的人 κ 轻链恒定结构域和CH1恒定结构域、Ig γ -2链C区,蛋白质登录号P01859;免疫球蛋白 κ 轻链(智人(homosapiens)),蛋白质登录号CAA09181。

[0420] 小规模Fab制备。从Fab文库转化(使用电穿孔感受态TG1细胞或化学感受态Top 10细胞)的大肠杆菌,使用单菌落同时接种主平板(琼脂LB+羧苄青霉素(50ug/mL)+2%葡萄糖)和工作平板(2mL/孔,96孔/板),其中每个孔包含1.5mL LB+羧苄青霉素(50ug/mL)+2%葡萄糖。将透气粘合封口膜(ABgene,Surrey,UK)施加到平板。将两个平板在30℃下温育12-16h;剧烈摇动工作平板。主平板储存在4℃下直到使用,使工作平板的细胞离心沉淀(4000rpm,4℃,20min)并重悬于1.0mL LB+羧苄青霉素(50ug/mL)+0.5mM IPTG中,在30℃下剧烈摇动5h诱导Fab的表达。在4℃下4000rpm离心诱导的细胞20min,并重悬于0.6mL Biacore HB-SEP缓冲液(10mM Hepes pH7.4,150mM NaCl,3mM EDTA,0.005%v/v P20)中。HB-SEP重悬细胞的裂解通过冷冻(-80℃)然后在37℃融化实现。在4℃下4000rpm离心细胞裂解物1小时以从含Fab上清液分离碎片,随后使用Millipore MultiScreen Assay System 96-Well Filtration Plate(0.2um)和真空歧管过滤。将过滤上清液注入传感器芯片上的全部CGRP,以使用Biacore对它们进行分析。从主平板恢复表达Fab的亲合力选择克隆,该克隆提供PCR、测序和质粒制备的模板DNA。

[0421] 大规模Fab制备。为获得动力学参数,按照以下方法大规模表达Fab。使用1mL的“起始”过夜培养物接种包含150mL LB+羧苄青霉素(50ug/mL)+2%葡萄糖的锥形瓶,该培养物来自亲合力选择Fab表达大肠杆菌克隆。将起始培养物的剩余部分(约3mL)用于制备质粒DNA(QIAprep mini-prep,Qiagen试剂盒),以进行测序和进一步操作。在30℃下剧烈摇动下温育大量培养物,直到OD_{600nm}达到1.0(通常12-16h)。通过在4℃下以4000rpm离心20min沉淀细胞,并将细胞重悬于150mL LB+羧苄青霉素(50ug/mL)+0.5mM IPTG中。在30℃下表达5h后,通过在4℃下以4000rpm离心20min沉淀细胞,并重悬于10mL Biacore HBS-EP缓冲液中,并使用单次冷冻(-80℃)/融化(37℃)循环裂解。通过在4℃下以4000rpm离心1小时沉淀细胞裂解物,并且收集上清液并过滤(0.2um)。将过滤上清液加载到PBS pH8平衡的Ni-NTA superflow sepharose(Qiagen,Valencia.CA)柱,然后用5倍柱体积的PBS(pH8)洗涤。使用PBS(pH8)+300mM咪唑以不同级分洗脱单个Fab。收集包含Fab的级分并在PBS中透析,然后通过ELISA定量,然后进行亲合力表征。

[0422] 全抗体制备。对于全抗体的表达,将重链和轻链可变区克隆至哺乳动物表达载体,并使用lipofectamine转染至HEK 293细胞,以进行瞬时表达。使用标准方法利用蛋白A纯化抗体。

[0423] 载体pDb.CGRP.hFcGI是包含G1抗体的重链的表达载体,并且适用于重链的瞬时或稳定表达。载体pDb.CGRP.hFcGI具有对应于以下区的核苷酸序列:鼠巨细胞病毒启动子区(核苷酸7-612);合成内含子(核苷酸613-1679);DHFR编码区(核苷酸688-1253);人生长激素信号肽(核苷酸1899-1976);G1的重链可变区(核苷酸1977-2621);包含以下突变的人重链IgG2恒定区:A330P331至S330S331(氨基酸编号参考野生型IgG2序列;参见Eur.J.Immunol.(1999)29:2613-2624)。载体pDb.CGRP.hFcGI在2005年7月15日保存于ATCC,并分配ATCC登录号PTA-6867。

[0424] 载体pEb.CGRP.hKGI是包含G1抗体的轻链的表达载体,并且适用于轻链的瞬时表达。载体pEb.CGRP.hKGI具有对应于以下区的核苷酸序列:鼠巨细胞病毒启动子区(核苷酸2-613);人EF-1内含子(核苷酸614-1149);人生长激素信号肽(核苷酸1160-1237);抗体G1轻链可变区(核苷酸1238-1558);人 κ 链恒定区(核苷酸1559-1882)。载体pEb.CGRP.hKGI在2005年7月15日保存于ATCC,并分配ATCC登录号PTA-6866。

[0425] 用于亲和力测定的Biacore分析。使用Biacore3000TM表面等离子共振 (SPR) 系统 (Biacore, INC, Piscataway NJ) 在25℃或37℃下测定G1单克隆抗体及其变体的亲和力。亲和力通过如下方式测定:通过预固定链霉亲和素 (SA传感器芯片) 捕获N-末端生物素酰化CGRP或片段,并测量在芯片上的全部CGRP或片段滴定的抗体G1 Fab片段或变体的结合动力学。所有Biacore测定均在HBS-EP运行缓冲液(10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005% v/v聚山梨酸酯P20)中进行。CGRP表面通过如下方式制备:将N-生物素化CGRP稀释至HBS-EP缓冲液达到小于0.001mg/mL的浓度,并使用可变接触时间将其注射到整个SA传感器芯片。对应于<50个应答单位 (RU) 的捕获水平的低容量表面用于高分辨率动力学研究,而高容量表面(约800RU的捕获CGRP)用于浓度研究、筛选和溶液亲和力测定。通过以两倍或三倍递增连续稀释抗体G1 Fab获得动力学数据,达到1 μ M-0.1nM(目标是0.1-10x预计 K_D)的浓度范围。样品通常以100 μ L/min注射1分钟,然后进行解离至少10分钟的时间。在每个结合循环后,使用溶于25% v/v乙醇的25mM NaOH再生表面,该表面可耐受超过几百次循环。使用BIAevaluation程序将整个滴定系列(通常以一式两份生成)全局拟合为1:1Langmuir结合模型。这返回每个结合相互作用的独特缔合和解离动力学速率常数对(分别为 k_{on} 和 k_{off}),它们的比率得到平衡解离常数($K_D = k_{off}/k_{on}$)。这样确定的亲和力(K_D 值)列于表6和7中。

[0426] 具有极低解离速率的结合相互作用的高分辨率分析。对于具有极低解离速率的相互作用(具体地讲,在25℃下芯片上抗体G1 Fab与-CGRP的结合),在两部分实验中获得亲和力。使用上述方案并作出以下修改。结合速率常数(k_{on})通过如下方式确定:将550nM-1nM范围的2倍滴定系列(一式两份)以100 μ L/min注射30秒,并且仅允许30秒的解离期。解离速率常数(k_{off})通过如下方式确定:一式两份注射三个浓度(高、中和低)的相同滴定系列30秒,并允许2小时的解离期。每个相互作用的亲和力(K_D)通过如下方式获得:组合在两种类型的实验获得的 k_{on} 和 k_{off} 值,如表5所示。

[0427] 通过Biacore测定溶液亲和力。大鼠 α -CGRP和F37A(19-37)人 α -CGRP的抗体G1的溶液亲和力在37℃下通过Biacore测定。使用高容量CGRP芯片表面(选择高亲和力人 α -CGRP进行检测),并且HBS-EP运行缓冲液以5 μ L/min流过。将5nM的恒定浓度(目标是等于或小于基于溶液的相互作用的预计 K_D 的抗体G1 Fab片段与竞争肽大鼠 α -CGRP或F37A(19-37)人 α -CGRP预先温育,最终浓度范围为3倍系列稀释的1nM至1 μ M。在不存在或存在基于溶液的竞争肽的情况下,将抗体G1 Fab溶液注射于芯片上的全部CGRP,并且在芯片表面检测到缺乏结合响应作为监测到溶液竞争的结果。使用校准曲线将这些结合响应转换为“游离Fab浓度”,该曲线通过在芯片上的全部CGRP单独滴定抗体G1 Fab(5、2.5、1.25、0.625、0.325和0nM)来构建。“游离Fab浓度”使用BIAevaluation软件对竞争基于溶液的肽的浓度绘制,该浓度用于生成每个数据点并拟合为溶液亲和力模型。这样(间接)测定的溶液亲和力如表5和7所示,并用于验证当Fab直接注射到SA芯片上的全部N-生物素化CGRP时获得的亲和力。这两种方法测定的亲和力之间的紧密一致性确认,将N-生物素化型CGRP限制到芯片不会改变其天

然溶液结合活性。

[0428] 下表5示出了通过Biacore测定的抗体G1与人 α -CGRP、人 β -CGRP、大鼠 α -CGRP和大鼠 β -CGRP的结合亲和力,该测定通过使Fab片段流经SA芯片上的N-生物素化CGRP来进行。为了更好地解析具有极低解离速率的结合相互作用的亲和力,亲和力还通过两部分实验测定,以补充该分析定位,还测定了大鼠 α -CGRP相互作用的溶液亲和力(如上文所述)。两个测定定位中测量的亲和力的紧密一致性确认,当N-生物素化并且限制到SA芯片时,溶液中天然大鼠 α -CGRP的结合亲和力未改变。

[0429] 表5. 芯片上的全部CGRP滴定的抗体G1 Fab的结合亲和力

[0430]	芯片上的 CGRP	温度(°C)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
	人 α -CGRP	25	1.86×10^5	7.80×10^{-6}	0.042 (7%, n=4)*
	人 α -CGRP	37	5.78×10^5	3.63×10^{-5}	0.063 (4%, n=2)*
	人 β -CGRP	37	4.51×10^5	6.98×10^{-5}	0.155
	大鼠 α -CGRP	25	5.08×10^4	6.18×10^{-5}	1.22 (12%, n=2)*
	大鼠 α -CGRP	37	1.55×10^5	3.99×10^{-4}	2.57* (溶液 $K_D=10$ (50%, n=4)**
	大鼠 β -CGRP	37	5.16×10^5	7.85×10^{-5}	0.152

[0431] * α -CGRP (大鼠和人) 的亲和力在高分辨率两部分实验中测定,其中监测解离期2小时(k_{on} 、 k_{off} 和 K_D 的值表示n次重复实验的平均值,其中标准偏差以方差百分比表示)。 β -CGRP (大鼠和人) 的亲和力仅使用20min解离期通过全局分析测定,其准确性不足以定量其极端解离速率(它们的解离速率可能慢于此处所述,因此它们的亲和力可能甚至更高)。抗体G1 Fab以极低速率从所有CGRP(除 α -大鼠CGRP之外)解离,其解离速率达到Biacore测定的分辨极限(尤其是在25°C下)。

[0432] **溶液亲和力通过测量缺乏结合响应来确定,该结合响应通过在芯片上的CGRP检测抗体G1Fab进行,将该抗体G1 Fab与基于溶液的大鼠 α -CGRP竞争剂预先温育。

[0433] 下表6显示与抗体G1及其对大鼠 α -CGRP和人 α -CGRP二者的亲和力相比,具有氨基酸序列变异的抗体。表6示出的变体的所有氨基酸取代相对于G1的序列进行描述。Fab片段的结合亲和力通过Biacore测定,该测定通过使Fab片段流经SA芯片上的全部CGRP进行。

[0434] 表6. 在37°C下通过Biacore测定的抗体G1变体的氨基酸序列和结合亲和力数据。

[0435]

克隆	L1	L2	H2	HC-FW3	α -大鼠 k_{off} (1/s)	α -大鼠 K_D (nM)	α -人 k_{off} (1/s)	α -人 K_D (nM)
G1					3.99×10^{-4}	2.57	3.63×10^{-5}	0.063
M1				A100L	1.10×10^{-3}		1.73×10^{-4}	
M2				L99A A100R	2.6×10^{-3}	58	3.1×10^{-4}	3
M3				L99A A100S	2.0×10^{-3}	61	2.1×10^{-4}	1.7
M4				L99A A100V	1.52×10^{-3}	84.4	6.95×10^{-5}	0.43
M5				L99A A100Y	7.35×10^{-4}	40.8	3.22×10^{-5}	0.20
M6				L99N	7.84×10^{-4}	43.6	1.33×10^{-4}	0.83
M7				L99N A100C	9.18×10^{-4}	51.0	2.43×10^{-4}	1.52
M8				L99N A100G	7.45×10^{-4}	41.4	9.20×10^{-5}	0.58
M9				L99N A100Y	n.d.	n.d.	1.00×10^{-5}	0.06
M10				L99S A100S	1.51×10^{-3}	83.9	1.73×10^{-4}	1.08
M11				L99S A100T	4.83×10^{-3}	268.3	2.83×10^{-4}	1.77
M12				L99S A100V	1.94×10^{-3}	107.8	1.01×10^{-4}	0.63
M13				L99T A100G	1.84×10^{-3}	102.2	1.86×10^{-4}	1.16
M14				L99T A100K	n.d.	n.d.	1.00×10^{-5}	0.06

[0436]

M15				L99T A100P	1.15×10^{-3}	63.9	1.58×10^{-5}	0.10
M16				L99T A100S	9.96×10^{-4}	55.3	1.65×10^{-4}	1.03
M17				L99T A100V	2.06×10^{-3}	114.4	1.85×10^{-4}	1.16
M18				L99V A100G	1.22×10^{-3}	67.8	7.03×10^{-5}	0.44
M19				L99V A100R	n.d.	n.d.	1.00×10^{-5}	0.06
M20	R28W			L99R A100L	1.44×10^{-3}	80.0	1.36×10^{-4}	0.85
M21	R28W			L99S	6.95×10^{-4}	15.2	1.42×10^{-4}	1.23
M22	R28W			L99T	1.10×10^{-3}	61.1	1.16×10^{-4}	0.73
M23	R28G			L99T A100V	7.99×10^{-4}	44.4	1.30×10^{-4}	0.81
M24	R28L			L99T A100V	1.04×10^{-3}	57.8	1.48×10^{-4}	0.93
M25	R28N			L99T A100V	1.4×10^{-3}	76	1.4×10^{-4}	1.3
M26	R28N		A57G	L99T A100V	9.24×10^{-4}	51.3	1.48×10^{-4}	0.93
M27	R28N T30A			L99T A100V	3.41×10^{-3}	189.4	3.57×10^{-4}	2.23
M28	R28N T30D		E54R A57N	L99T A100V	1.25×10^{-3}	69.4	9.96×10^{-5}	0.62
M29	R28N T30G			L99T A100V	3.59×10^{-3}	199.4	3.80×10^{-4}	2.38
M30	R28N T30G		E54K A57E	L99T A100V	6.38×10^{-3}	354.4	5.90×10^{-4}	3.69
M31	R28N T30G		E54K A57G	L99T A100V	3.61×10^{-3}	200.6	3.47×10^{-4}	2.17
M32	R28N T30G		E54K A57H	L99T A100V	2.96×10^{-3}	164.4	2.71×10^{-4}	1.69
M33	R28N T30G		E54K A57N S58G	L99T A100V	9.22×10^{-3}	512.2	7.50×10^{-4}	4.69
M34	R28N T30G		E54K A57N S58T	L99T A100V	2.17×10^{-3}	120.6	6.46×10^{-4}	4.04
M35	R28N T30G		E54K A57S	L99T A100V	3.99×10^{-3}	221.7	3.39×10^{-4}	2.12
M36	R28N T30R			L99T A100V	4.79×10^{-3}	266.1	2.39×10^{-4}	1.49
M37	R28N T30S		A57G	L99T A100V	1.45×10^{-3}	80.6	2.26×10^{-4}	1.41
M38	R28N T30W			L99T A100V	5.11×10^{-3}	283.9	2.18×10^{-4}	1.36
M39	R28N	G50A L56T	A57N S58Y	L99T A100V	9.95×10^{-3}	552.8	4.25×10^{-4}	2.66
M40	R28N	G50A L56T	E54K A57L	L99T A100V	0.36	20000.0	1.28×10^{-3}	8.00
M41	R28N	G50A L56T	E54K A57N E64D	L99T A100V	4.53×10^{-3}	251.7	2.10×10^{-4}	1.31
M42	R28N	G50A L56T	E54K A57N	L99T A100V	7.52×10^{-3}	417.8	4.17×10^{-4}	2.61

[0437]

			H61F					
M43	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58C	L99T A100V	4.53×10^{-3}	251.7	2.63×10^{-4}	1.64
M44	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	6.13×10^{-3}	443	2.10×10^{-4}	2.05
M45	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E E64D	L99T A100V	5.58×10^{-3}	259	2.11×10^{-4}	1.85
M46	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E H61F	L99T A100V	2.94×10^{-3}	163.3	5.39×10^{-4}	3.37
M47	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58G	L99T A100V	8.23×10^{-3}	457.2	3.32×10^{-4}	2.08
M48	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58L	L99T A100V	0.0343	1905.6	8.42×10^{-4}	5.26
M49	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58Y H61F	L99T A100V	0.0148	822.2	5.95×10^{-4}	3.72
M50	R28N	G50A L56T	E54K A57R	L99T A100V	5.30×10^{-3}	294.4	4.06×10^{-4}	2.54
M51	R28N	L56I	E54K A57G	L99T A100V	1.18×10^{-3}	65.6	1.31×10^{-4}	0.82
M52	R28N	L56I	E54K A57N S58A	L99T A100V	2.29×10^{-3}	127.2	2.81×10^{-4}	1.76
M53	R28N	L56I	E54K A57N S58G	L99T A100V	1.91×10^{-3}	106.1	3.74×10^{-4}	2.34
M54	R28N T30A	G50A	E54K A57N S58P	L99T A100V	2.16×10^{-3}	120.0	1.79×10^{-3}	11.19
M55	R28N T30A	L56S	E54K A57N S58E E64D	L99T A100V	5.85×10^{-3}	325.0	4.78×10^{-4}	2.99
M56	R28N T30D	L56S	E54K A57N H61F	L99T A100V	9.35×10^{-3}	519.4	4.79×10^{-4}	2.99
M57	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58E	L99T A100V	0.0104	1,200	3.22×10^{-4}	3.08
M58	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58I H61F	L99T A100V	不结合	n.d.	1.95×10^{-3}	12.19
M59	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58N H61F	L99T A100V	0.0123	683.3	5.24×10^{-4}	3.28
M60	R28N	L56S	E54K	L99T	0.0272	1511.1	9.11×10^{-4}	5.69

[0438]

	T30D		A57N S58R H61F	A100V				
M61	R28N T30G	A51H	E54Q A57N H61F	L99T A100V	5.21×10^{-3}	289.4	4.59×10^{-4}	2.87
M62	R28N T30G	A51H L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	5.75×10^{-3}	242	5.57×10^{-4}	5.86
M63	R28N T30G	G50A	E54K A57N S58T	L99T A100V	2.65×10^{-3}	147.2	1.50×10^{-3}	9.38
M64	R28N T30G	G50A	E54K A57N S58V	L99T A100V	0.0234	1300.0	1.32×10^{-3}	8.25
M65	R28N T30G	G50A L56I	E54K A57C	L99T A100V	4.07×10^{-3}	226.1	8.03×10^{-4}	5.02
M66	R28N T30G	L56I	E54K A57E	L99T A100V	5.11×10^{-3}	283.9	5.20×10^{-4}	3.25
M67	R28N T30G	L56I	E54K A57F	L99T A100V	1.71×10^{-3}	95.0	8.20×10^{-4}	5.13
M68	R28N T30G	L56I	E54K A57N S58D E64D	L99T A100V	6.76×10^{-3}	375.6	4.28×10^{-4}	2.68
M69	R28N T30G	L56I	E54K A57N S58E	L99T A100V	1.81×10^{-3}	100.6	7.33×10^{-4}	4.58
M70	R28N T30G	L56I	E54K A57S	L99T A100V	6.07×10^{-3}	337.2	5.59×10^{-4}	3.49
M71	R28N T30G	L56I	E54K A57Y	L99T A100V	2.12×10^{-3}	117.8	1.28×10^{-3}	8.00
M72	R28N T30G	L56S	E54K	L99T A100V	3.95×10^{-3}	219.4	4.00×10^{-4}	2.50
M73	R28N T30G	L56S	E54K A57N S58Y E64D	L99T A100V	3.00×10^{-3}	166.7	2.55×10^{-4}	1.59
M74	R28N T30G	L56S	E54K A57S	L99T A100V	6.03×10^{-3}	335.0	5.97×10^{-4}	3.73
M75	R28N T30G	L56S	E54K A57V	L99T A100V	1.87×10^{-2}	1038.9	1.16×10^{-3}	7.25
M76	R28N T30S	G50A L56T	A57G	L99T A100V	1.16×10^{-3}	64.4	3.64×10^{-4}	2.28
M77	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57D	L99T A100V	0.0143	794.4	4.77×10^{-4}	2.98
M78	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57N S58T	L99T A100V	0.167	9277.8	1.31×10^{-3}	8.19
M79	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57P	L99T A100V	0.19	10555.6	1.29×10^{-3}	8.06
M80	R28N T30S	L56I	E54K A57N S58V	L99T A100V	0.0993	5516.7	2.09×10^{-3}	13.06
M81	R28N T30S	L56S	E54K A57N S58E	L99T A100V	4.29×10^{-3}	238.3	4.90×10^{-4}	3.06

[0439]

M82	R28N T30V	A51H L56T	A57N	L99T A100V	6.99×10^{-3}	388.3	8.77×10^{-4}	5.48
M83	R28N T30V	A51H L56T	E54K A57N S58M H61F	L99T A100V	不结合	n.d.	9.33×10^{-4}	5.83
M84	R28N T30V	A51H L56T	E54N A57N	L99T A100V	1.76×10^{-2}	977.8	1.08×10^{-3}	6.75

[0440] 所有CDR均包括Kabat和Chothia CDR。氨基酸残基按顺序编号(参见图5)。所有克隆具有与G1相同的L3+H1+H3序列。

[0441] $K_D = k_{off}/k_{on}$ 。除了加下划线的之外,所有 k_{off} 值均以筛选模式测定,它们通过Fab浓度系列的全局分析获得(G1以高分辨率模式分析)。因此,加下划线的 K_D 值通过测定 k_{on} 来通过实验测定。预计其它 k_{on} 值与M25相同。

[0442] n.d. = 未测定

[0443] 为确定抗体G1识别的人 α -CGRP上的表位,使用上述Biacore测定。人 α -CGRP以N-生物素化型购买,以便能够通过SA传感器芯片进行高亲和力捕获。在不存在或存在CGRP肽的情况下测定G1 Fab片段与芯片上人 α -CGRP的结合。通常,将2000:1摩尔肽/Fab溶液(例如,10 μ M肽于50nM G1Fab中)注射到芯片上人 α -CGRP。图6示出了被竞争肽阻断的结合的百分比。图6所示的数据表明,阻断100%的G1 Fab与人 α -CGRP的结合的肽为1-37 (WT)、8-37、26-37、P29A (19-37)、K35A (19-37)、K35E (19-37) 和人 α -CGRP的K35M (19-37); β -CGRP (WT) 的1-37;大鼠 α -CGRP (WT) 的1-37;以及大鼠 β -CGRP (WT) 的1-37。所有这些肽均为C末端酰胺化的。人 α -CGRP的肽F37A (19-37) 和19-37 (后者的C末端未酰胺化) 还阻断约80%至90%的G1 Fab与人 α -CGRP的结合。人 α -CGRP的肽1-36 (C末端未酰胺化) 阻断约40%的G1 Fab与人 α -CGRP的结合。人 α -CGRP的肽片段19-36 (C末端酰胺化); 人 α -CGRP的肽片段1-13和1-19 (两者的C末端均未酰胺化); 以及人糊精、降钙素和肾上腺髓质素 (均为C末端酰胺化的) 不竞争G1 Fab与芯片上人 α -CGRP的结合。这些数据显示,G1靶向CGRP的C末端表位,并且最末端残基(F37)及其酰胺化的鉴定对于结合都是重要的。

[0444] 还测定了G1 Fab与人 α -CGRP的变体的结合亲和力(在37°C下)。下表7显示,通过用G1 Fab滴定芯片上的全部N-生物素酰化人 α -CGRP和变体可直接测定亲和力。表7中的数据表明,抗体G1结合C末端表位,其中F37和G33是最重要的残基。当额外的氨基酸残基(丙氨酸)加入C末端(酰胺化)时,G1不结合CGRP。

[0445] 表7. 在37°C下测量的G1 Fab与人 α -CGRP和变体的结合亲和力(氨基酸序列参见表4)

[0446]

芯片上的CGRP	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
1-37 (WT)	4.68×10^5	7.63×10^{-5}	0.16 (分辨率 $K_D=0.06$)
19-37	4.60×10^5	7.30×10^{-5}	0.16
25-37	3.10×10^5	8.80×10^{-5}	0.28
F27A (25-37)	3.25×10^5	1.24×10^{-4}	0.38
V28A (25-37)	3.32×10^5	9.38×10^{-5}	0.28
P29A (25-37)	2.26×10^5	1.78×10^{-4}	0.79
T30A (25-37)	1.79×10^5	8.41×10^{-5}	0.47

N31A (25-37)	2.17×10^5	1.14×10^{-4}	0.53
V32A (25-37)	2.02×10^5	3.46×10^{-4}	1.71
G33A (25-37)	2.07×10^5	0.0291	141
S34A (25-37)	2.51×10^5	7.64×10^{-4}	3.04
K35A (19-37)	2.23×10^5	2.97×10^{-4}	1.33
K35E (19-37)	5.95×10^4	5.79×10^{-4}	9.73
K35M (19-37)	2.63×10^5	1.34×10^{-4}	0.51
K35Q (19-37)	1.95×10^5	2.70×10^{-4}	1.38
F37A (25-37)	8.90×10^4	8.48×10^{-3}	95 (溶液 $K_D = 172\text{nM}$)
38A (25-38A)	-	-	未检测到结合

[0447] 上述数据表明, 抗体G1结合的表位在人 α -CGRP的C末端上, 并且人 α -CGRP上的氨基酸33和37对于抗体G1的结合是重要的。另外, 残基F37的酰胺化对于结合也是重要的。

[0448] 实施例5: 抗CGRP拮抗剂抗体G1对刺激大鼠隐神经导致的皮肤血管舒张的影响

[0449] 为测试抗CGRP抗体G1的拮抗剂活性, 使用实施例3所述的大鼠模型测试抗体对刺激大鼠隐神经引起的皮肤血管舒张的影响。简而言之, 用2%异氟烷使大鼠维持于麻醉状态。由于隐神经的交感神经纤维的伴随刺激, 在实验开始时给予甲苯磺酸溴苄铵 (30mg/kg, 静脉内施用), 以使血管收缩最小化。使用恒温连接至温控加热罩的直肠探头将体温维持在37°C。手术暴露右后肢的隐神经, 在近侧剖切并用塑料包裹物覆盖以防止干燥。激光多普勒探头置于后爪皮肤的中部背侧上, 这是隐神经支配的区域。皮肤血流量以血细胞通量测量, 使用激光多普勒流量计对其进行监测。在甲苯磺酸溴苄铵注射后三十至四十五分钟, 在测定抗体在注射两小时内的效应的实验中, 当稳定基线通量 (变化小于5%) 建立至少5min时, 将神经置于铂双极电极上, 并且进行电刺激 (2Hz、10V、1ms、达30秒), 20分钟后重复刺激。将这两次刺激的血流量响应平均值用于建立电刺激的基线响应 (时间0)。然后静脉内施用 (i.v.) 抗体G1 (1mg/kg或10mg/kg) 或媒介物 (含0.01% Tween 20的PBS体积等于10mg/kg G1)。随后在抗体施用后30min、60min、90min和120min刺激 (2Hz、10V、1ms、达30秒) 神经。使动物维持于麻醉状态大约三小时的时段。对于电脉冲刺激的每次通量响应, 皮肤血流量的累积变化通过通量-时间曲线下面积 (AUC, 等于通量变化乘以时间变化) 估计。

[0450] 如图7所示, 当在抗体施用后90min电刺激隐神经时, 与媒介物相比, 电脉冲施加于隐神经刺激的血流量增加受到1mg/kg (静脉内施用) 抗体G1存在的显著抑制。当在抗体施用后90分钟和120分钟电刺激隐神经时, 与媒介物相比, 电脉冲施加于隐神经刺激的血流量增加受到10mg/kg (静脉内施用) 抗体G1存在的显著抑制。

[0451] 如上文所述, 在测定抗体在隐神经测定中的较长时间点的效应的实验中, 在准备用于隐神经刺激的动物前24小时或7天给大鼠静脉内注射指定剂量的抗体。在这些实验中, 给药前在单只大鼠中建立电脉冲刺激的基线响应是不可能的, 因此治疗组相当于在24小时或7天给予媒介物 (PBS, 0.01% Tween 20) 的动物。

[0452] 如图8A和8B所示, 与在相同时间点给予的媒介物组相比, 在刺激前24小时或7天以10mg/kg或3mg/kg G1给药的动物组中, 隐神经刺激引起的中背部后爪皮肤的血流量增加受到显著抑制。

[0453] 图8C示出了应用于图8A和8B所示的剂量响应数据的曲线拟合分析, 以测定50%最

大效应 (EC_{50}) 所需的剂量。24 小时的 EC_{50} 为 1.3mg/kg, 7 天的 EC_{50} 稍小 (0.8mg/kg)。

[0454] 实施例6:硬脑膜动脉(封闭式颅窗)测定中抗CGRP拮抗剂抗体mu7E9的急性效应

[0455] 封闭式颅窗模型:本实验的目的是测定抗CGRP拮抗剂抗体的急性效应,并将其与CGRP受体拮抗剂BIBN4096BS的急性效应进行比较。实验如上文所述进行(Williamson等, Cephalalgia 17(4):518-24(1997)),并作出以下修改。通过腹膜内施用70mg/kg戊巴比妥麻醉Sprague Dawley大鼠(300-400g)。静脉内施用20mg/kg/h戊巴比妥维持麻醉状态。将套管插入大鼠颈静脉以递送所有药物。使用穿过股动脉进入腹主动脉的探针(mikro-tip导管, Millar Instruments)监测血压。切开大鼠的气管,并使呼吸速率维持在75次呼吸/分钟3.5mL的体积。在头部固定于立体定位仪器中并移除头皮后,通过用牙钻打薄骨质,在矢状缝侧面的左顶叶区作一 2×6 mm的窗口。使用显微操作器将铂双极电极下移至表面,并以重矿物油覆盖。在电极窗口的侧面,作另一 5×6 mm的窗口,并填充重矿物油,用CCD相机和电视度量分析仪(Living Systems)通过其连续监测一束中脑膜动脉(MMA)的直径。在准备工作后,使大鼠仰卧放置不小于45分钟。建立电刺激的基线响应(15V、10hz、0.5ms脉冲、30秒),然后静脉内给予大鼠实验化合物(10mg/kg mu7E9、300g/kg BIBN4096BS或PBS 0.01% Tween 20。在给药后5(BIBN4096BS)、30、60、90和120分钟进行另外的电刺激。使用图表软件(ADInstruments)记录所有数据。

[0456] 如图9所示,10mg/kg的mu7E9在给药后60分钟内显著阻断电场刺激引起的MMA扩张,并且在整个测定期间(120分钟)维持效果。作为比较,BIBN4096BS在给药的5分钟内阻断MMA扩张,但效果在90分钟完全消失。阻断的幅度相当于BIBN4096BS和mu7E9之间。

[0457] 实施例7:硬脑膜动脉(封闭式颅窗)测定中抗CGRP拮抗剂抗体G1的慢性效应

[0458] 本实验的目的是测定抗CGRP抗体在给药后7天是否仍阻断电刺激的MMA扩张。除以下例外之外,大鼠的准备与上述急性实验(实施例6)相同。在进行封闭式颅窗准备和刺激之前7天给大鼠静脉内注射(10mg/kg、3mg/kg或1mg/kg G1)。正如急性实验,在给药前建立电刺激的基线扩张响应是不可能的,因此将抗体组与媒介物(PBS, 0.01% Tween 20)给予对照组中的MMA扩张相比较。使大鼠仰卧放置不小于45分钟后,以30分钟间隔电刺激硬脑膜。以2.5V、5V、10V、15V和20V进行刺激,均为10Hz、0.5ms脉冲达30秒。

[0459] 如图10所示,在10至20伏的范围内10mg/kg和3mg/kg G1显著阻断电刺激引起的MMA扩张。该数据显示,在给药后最多7天G1可阻断电刺激的MMA扩张。

[0460] 实施例8:吗啡戒断热潮红模型

[0461] 吗啡戒断大鼠模型是更年期热潮红机制的确立啮齿动物模型(Sipe等, Brain Res. 1028(2):191-202(2004); Merchenthaler等, Maturitas 30:307-316(1998); Katovich等, Brain Res. 494:85-94(1989); Simpkins等, Life Sciences 32:1957-1966(1983))。基本上,通过在皮肤下植入吗啡颗粒会使大鼠对吗啡上瘾。在上瘾时,即用纳洛酮(阿片样物质拮抗剂)注射动物,立即使动物进入戒断。该戒断伴有皮肤温度升高、核心体温降低、心率提高和血清促黄体激素增加。这些均类似于人热潮红发生的幅度和安排(Simpkins等, Life Sciences 32:1957-1966(1983))。此外,如果在诱导戒断前用雌二醇处理大鼠,则热潮红症状减少(Merchenthaler等, Maturitas 30:307-316(1998))。这就是为什么吗啡戒断模型被认为能模拟临床热潮红的原因。

[0462] 卵巢切除大鼠从Charles River Laboratories订购。卵巢切除后不小于7天通过

皮下植入吗啡颗粒(75mg吗啡碱)建立吗啡依赖性。两天后再植入2粒颗粒。在接下来的日子里,给大鼠静脉内注射10mg/kg 4901[**]或媒介物(PBS,0.01% tween)。在第二次植入颗粒后两天,用开他敏(90mg/kg)麻醉大鼠,并稍微约束大鼠。使用表面温度热电偶测量尾巴基部,并使用直肠热电偶测量体核温度。使用图表软件(ADInstruments)记录数据。在记录15分钟的稳定基线温度后,皮下注射纳洛酮(1mg/kg)。再连续记录温度60分钟。结果如图11A和11B所示。

[0463] 实施例9:慢性偏头痛的治疗

[0464] 年龄45岁的人类男性受试者被鉴定为患有慢性偏头痛至少三个月。患有慢性偏头痛的鉴定通过在筛选前观察频发性头痛的病史实现,该病史暗示慢性偏头痛(例如,15天/月)持续至少三个月。头痛频率的检验通过将来收集的基线信息实现,这些信息显示在至少15天的头痛中,至少8天/月满足以下标准中的任一者:i.确认为偏头痛发作;和/或ii.有或伴有偏头痛前兆。

[0465] 为了减少受试者中的偏头痛的发作,给受试者施用225mg剂量的抗CGRP拮抗剂抗体(例如,抗体G1)。抗CGRP拮抗剂抗体以浓度为150mg/mL的液体制剂提供。225mg剂量通过在受试者身体上臂背部皮下注射1.5mL施用。或者,该剂量可通过静脉内输注提供给受试者。在这种情况下,5.85mL 150mg/mL抗CGRP抗体可在静脉输液袋中与0.9%氯化钠溶液(生理盐水)组合,在输液袋中达到130mL的总体积。在一小时的过程中给受试者静脉内输注100mL静脉输液袋体积,总剂量225mg。每二十八天重复给药,直到观察到偏头痛的发作减少。使用多个标准检查慢性偏头痛的发作减少,这些标准包括在受试者中观察的头痛天数、头痛发生的小时数(例如,头痛小时)、头痛的严重性以及偏头痛的天数。

[0466] 实施例10:慢性偏头痛的治疗

[0467] 年龄37岁的人类女性受试者被鉴定为患有慢性偏头痛至少三个月。患有慢性偏头痛的鉴定通过在筛选前观察频发性头痛的病史实现,该病史暗示慢性偏头痛(例如,15天/月)持续至少三个月。头痛频率的检验通过将来收集的基线信息实现,这些信息显示在至少15天的头痛中,至少8天/月满足以下标准中的任一者:i.确认为偏头痛发作;和/或ii.有或伴有偏头痛前兆。

[0468] 为了减少受试者中的偏头痛的发作,给受试者施用675mg初始负荷剂量的抗CGRP拮抗剂抗体(例如,抗体G1)。抗CGRP拮抗剂抗体以浓度为150mg/mL的液体制剂提供。675mg负荷剂量通过三次225mg皮下注射1.5mL至受试者身体的各个区(例如,上臂背部、下腹腔/腹部/腰身、前股等)来施用。每二十八天重复给药225mg(例如,通过受试者的臂一次皮下注射1.5mL),直到观察到偏头痛的发作减少。使用多个标准检查慢性偏头痛的发作减少,这些标准包括在受试者中观察的头痛天数、头痛发生的小时数(例如,头痛小时)、头痛的严重性以及偏头痛的天数。

[0469] 实施例11:慢性偏头痛的治疗

[0470] 年龄23岁的人类男性受试者被鉴定为患有慢性偏头痛至少三个月。患有慢性偏头痛的鉴定通过在筛选前观察频发性头痛的病史实现,该病史暗示慢性偏头痛(例如,15天/月)持续至少三个月。头痛频率的检验通过将来收集的基线信息实现,这些信息显示在至少15天的头痛中,至少8天/月满足以下标准中的任一者:i.确认为偏头痛发作;和/或ii.有或伴有偏头痛前兆。

[0471] 为了减少受试者中的偏头痛的发作,给受试者施用900mg剂量的抗CGRP拮抗剂抗体(例如,抗体G1)。抗CGRP拮抗剂抗体以浓度为150mg/mL的液体制剂提供。900mg剂量通过四次225mg皮下注射1.5mL至受试者身体的各个区(例如,上臂背部、下腹腔/腹部/腰身、前股等)来施用。每二十八天重复给药,直到观察到偏头痛的发作减少。使用多个标准检查慢性偏头痛的发作减少,这些标准包括在受试者中观察的头痛天数、头痛发生的小时数(例如,头痛小时)、头痛的严重性以及偏头痛的天数。

[0472] 实施例12:偶发性偏头痛的治疗

[0473] 年龄28岁的人类男性受试者被鉴定为患有高频率偶发性偏头痛。使用包括以下的标准鉴定受试者患有高频率偶发性偏头痛:在筛选前具有头痛病史超过8天/月达至少3个月;以及通过将来收集的基线信息检验头痛频率,这些信息显示在8至14天的头痛(任何类型)中,至少8天满足以下标准中的至少一者:i.偏头痛;ii.可能偏头痛;和/或iii.使用曲坦或麦角化合物。

[0474] 为了减少受试者中的偏头痛的发作,给受试者施用675mg剂量的抗CGRP拮抗剂抗体(例如,抗体G1)。抗CGRP拮抗剂抗体以浓度为150mg/mL的液体制剂提供。675mg剂量通过三次225mg皮下注射1.5mL至受试者身体的各个区(例如,上臂背部、下腹腔/腹部/腰身、前股等)来施用。每二十八天重复给药,直到观察到偏头痛的发作减少。使用多个标准检查偶发性偏头痛发作的减少,这些标准包括在受试者中观察到的头痛天数、头痛发生的小时数(例如,头痛小时)、头痛的严重性以及偏头痛的天数。

[0475] 实施例13:偶发性偏头痛的治疗

[0476] 年龄52岁的人类女性受试者被鉴定为患有高频率偶发性偏头痛。使用包括以下的标准鉴定受试者患有高频率偶发性偏头痛:在筛选前具有头痛病史超过8天/月达至少3个月;以及通过将来收集的基线信息检验头痛频率,这些信息显示在8至14天的头痛(任何类型)中,至少8天满足以下标准中的至少一者:i.偏头痛;ii.可能偏头痛;和/或iii.使用曲坦或麦角化合物。

[0477] 为了减少受试者中的偏头痛的发作,给受试者施用225mg剂量的抗CGRP拮抗剂抗体(例如,抗体G1)。抗CGRP拮抗剂抗体以浓度为150mg/mL的液体制剂提供。225mg剂量通过在受试者身体上臂背部皮下注射1.5mL施用。每二十八天重复给药,直到观察到偏头痛的发作减少。使用多个观察结果检查偶发性偏头痛发作的减少,包括在受试者中观察头痛天数、头痛发生的小时数、头痛的严重性以及偏头痛的天数。

[0478] 实施例14:非临床毒理学和药代动力学

[0479] 在Sprague-Dawley (SD) 大鼠和食蟹猴的1个月静脉内重复剂量毒性研究中,抗CGRP拮抗剂抗体G1具有很好的耐受性,并且在这些研究的任一者中均未测定到靶标器官毒性。针对大鼠和猴子研究建立100mg/kg/周的无不良事件水平(NOAEI)。该剂量水平对应于大鼠和猴子中分别全身暴露至2,570和3,440 $\mu\text{g/mL}$ 的最大浓度(C_{max})和194,000 $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 和299,000 $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ (第22天)的曲线下面积(AUC(0-168h))。

[0480] 在3个月静脉内/皮下大鼠研究中,未鉴定到靶标器官毒性,并且G1能够很好地耐受最多300mg/kg的最高测试剂量。在3个月猴子研究中,作为免疫复合物沉积的结果,在 $\geq 100\text{mg/kg}$ 下观察到睫状动脉的血管周炎症。这些发现归因于猴子对人源化抗体的免疫原性响应,并且不视为具有临床相关性。在该猴子研究中,最高测试剂量300mg/kg比最高预期临

床剂量2,000mg或29mg/kg大至少10倍(以mg/kg计)(假设受试者平均体重为70kg)。

[0481] 实施例15:临床药代动力学

[0482] 在单次静脉内暴露后,通过四次随机安慰剂对照双盲研究检验抗体G1的药代动力学,检验剂量在10和2,000mg之间。在1小时静脉内输注结束后立即达到最大血浆浓度(C_{max})。C_{max}的中值时间(T_{max})在1.0至3.0小时的范围内,然后是双相下降。C_{max}和总暴露大致随G1的剂量逐渐增加而线性增加。终末半衰期(t_{1/2})在36.4至48.3天的范围内。无证据表明肝脏中发生G1代谢,代谢的主要模式是蛋白酶体降解。

[0483] 一个研究定义了30mg和300mg剂量的药代动力学,所述剂量给予两次,相隔两周。最大浓度和浓度-时间曲线下面积随剂量的增加而增加。在第二剂量后,表观终末半衰期(t_{1/2})为41.2天(30mg)和50.0天(300mg)(算术平均值)。在相隔15天施用的两次静脉内剂量后,G1的血浆积聚比率为1.5(30mg)和1.4(300mg)。

[0484] 实施例16:临床安全和药代动力学

[0485] 在六次研究中,将抗体G1施用于118名健康男性和女性,而57名男性和女性受试者接受安慰剂。该研究包括在0.2mg至最多2,000mg的范围内的单次静脉内剂量,两次静脉内剂量最多300mg,每14天给予一次,并且皮下施用225和900mg。六次研究包括:两次在健康男性中的静脉内单剂量逐渐增加PK和药效动力学(PD)研究(研究B0141001和B0141002);两组安慰剂控制交叉研究,以在健康志愿者中检查静脉内施用抗体G1对辣椒碱潮红应答的急性效应(B0141006);在健康男性和女性志愿者中抗体G1的平行组重复剂量研究(B0141007);单剂量研究,以评估给健康女性志愿者静脉内施用最多2,000mg剂量的安全性和耐药性(B0141008)以及比较静脉内和皮下施用之间的相对安全性和生物利用率的研究(G1-SC-IV)。

[0486] 六次研究汇总于下表11中。在五次静脉内研究(B0141001、B0141002、B0141006、B0141007和B0141008)中,三次具有实际上相同的设计和评估。研究B014100测试单次一小时静脉内输注给予的0.2mg、1mg和3mg剂量。该研究具有平行设计。参与者在输注后七天限定在诊所中,在这几天内每天进行多次评估。在出院(第14天)后一周再次对患者进行评估,然后在输注后一个月、两个月和三个月进行。研究B0141002测试10mg至1000mg范围内的剂量作为单次施用。最后,研究B0141008测试300mg、1000mg、1500mg或2000mg剂量。研究B0141006与其它研究不同,因为它还旨在通过在抗体G1静脉内输注后最多一周测定辣椒碱潮红抑制来整合药效动力学读数。

[0487] 对于静脉内研究,不良事件(AE)曲线仅报告第一剂量期。研究B0141007使用平行设计测试多剂量的抗体G1,所述抗体G1静脉内给予30或300mg,相隔两周。通过交互式网络系统将随机化序列分配给每名合格受试者,该系统包含治疗安排。随机化架构由主管统计师开发。所有研究的参与者通常为健康男性和女性(年龄18至65岁);所有参与者均签署知情同意书。所有研究均经伦理审查委员会(IRB)批准。AE定义为临床研究参与者的任何不幸医疗事件,该事件与研究药物存在或不存在因果关系。在研究药物或安慰剂施用后观察到的AE称为“治疗中出现的”AE(TEAE),而无论是否与研究药物存在潜在因果关系。在适当的时间间隔随访所有经历TEAE的受试者,直到事件得到解决或直到事件稳定和/或达到新的基线。所有TEAE分为轻度、中度或重度。按照推理,严重AE(SAE)定义为任何导致死亡的剂量产生的任何不幸医疗事件,是危及生命的(即受试者在事件发生时具有立即死亡的风险),

需要住院治疗或延长目前的住院治疗,导致持久的或显著的无能/失能(例如,基本上破坏受试者发挥正常生命功能的能力),导致先天异常/出生缺陷或任何其它医疗重要性事件。当出现以下情况之一时视为治疗相关的AE (TRAE):1) 可鉴定AE的发病和研究产品的施用之间似是而非的时间关系;2) AE不易于通过患者的临床状态、并发疾病或伴随治疗解释;3) AE消除研究产品的终止或剂量减少。

[0488] 在筛选时、给药前、输注结束后和患者禁闭于诊所期间的多个时间,以及所有就诊时测定血压、脉搏率和口腔温度。实验室测试包括血清化学、血液学和尿液分析。血液学、化学、凝固和尿液安全性实验室测试在多个研究时间进行。在筛选、第1天给药前、输注结束后和第一天期间的五个其它时间,以及所有就诊时记录ECG。QTcF值使用Fridericia (QTcF) 心率修正公式获得。ECG参数QT间期、心率、QTcF间期、PR间期和QRS间期的绝对值以及从基线的变化通过组、治疗 and 给药后时间评估。除上述安全性评估之外,方案B014008还包括基线和给药后的三个时间点(第28天、第84天和第168天)的完全眼科学评估。

[0489] 临床数据和生命体征使用描述性表格和总结统计汇总。实验室和其它安全性数据作为任何变化(参考范围外部的值),以及任何临床相关变化(按照推理定义)的函数汇总。摘要表格根据剂量分层,并且收集所有研究数据。此外,所有抗体G1暴露的统一数据的比较与安慰剂进行比较。安慰剂还与100mg和更高(100mg、300mg、1000mg、1500mg和2000mg)的抗体G1剂量,以及1000mg和更高(1000mg、1500mg和2000mg)的抗体G1剂量进行比较。

[0490] 在静脉内/皮下研究(G1-SC-IV)中,三十六名受试者随机接受单次施用抗体G1(225或900mg)或安慰剂,所述抗体G1或安慰剂通过皮下(SC)丸剂注射或1小时静脉内输注递送。受试者禁闭于临床研究单位,直到给药后七天,并定期返回诊所进行另外的门诊检查,直到研究第90天。在第1天(给药前、1、6、12小时)、第3天、第7天大规模进行ECG,而受试者在研究完成时(第90天)禁闭一次。在给药前、第1、3、7和90天收集生命体征,包括温度、血压和心率。

[0491] 表11

研究	研究群体	用抗体 G1 治疗
[0492] B0141001	健康成年男性(n=24)	每组八名, 单次静脉内(IV)输注 0.2、1 或 3mg(六名/组, 积极治疗;
		安慰剂组两名)
B0141002	健康成年男性(n=40)	每组八名, 单次静脉内输注 10、30、100、300 或 1000mg(六名/组, 积极治疗; 安慰剂组 10 名)
B0141006	健康成年男性(n=12)	两个改良交叉组, 每组六名, 安慰剂或静脉内输注 300mg。在第一阶段, 所有参与者接受安慰剂。第二阶段(本文所包括), 12 名参与者接受安慰剂, 11 名接受 300mg。
[0493] B0141007	健康成年男性和女性(n=21)	每组 10 或 11 名, 两次静脉内输注, 相隔两周, 30 或 300mg(六名/组, 积极治疗; 安慰剂组九名)
B0141008	健康成年女性(n=31)	单次静脉内输注 300、1000、1500 或 2000mg(2000mg 组五名; 其余治疗组六名/组 安慰剂组八名)
G1-SC-IV	三十六名受试者(n=36)	单次皮下(SC)丸剂注射或单次静脉内输注 225 或 900mg

[0494] 在五个静脉内研究(0.2至2,000mg)评估的广泛剂量范围内,静脉内施用抗体G1具

有可接受的耐受性。表8按静脉内研究的剂量汇总了总体不良事件 (AE) 率。根据这些耐受性结果,未出现明显安全性问题。在静脉内研究的所有试验中,接受安慰剂的参与者报告平均出现1.3次治疗中出现的不良事件 (TEAE)。这些是所有报告事件,与研究者和研究药物关系的观点无关。在所有静脉内G1剂量中,该比率为1.4次TEAE/受试者。接受100mg或更高的G1剂量的受试者具有平均1.5次TEAE;接受1,000mg或更高剂量的那些受试者具有平均1.6次TEAE。

[0495] 表8

[0496]

	评估受试者的AE	AE的数量-n (N)	出现AE的受试者-n (N)	出现严重AE的受试者-n (N)	出现重度AE的受试者-n (N)	AE终止的受试者-n (N)	剂量减少或暂时终止-n (N)
安慰剂	45	57 (11)	23 (8)	0	0	2 (1)	0
0.2mg	6	5 (0)	2 (0)	0	0	0	0
1mg	6	1 (1)	3 (0)	0	0	0	0
3mg	6	10 (2)	4 (1)	0	0	0	0
10mg	6	5 (1)	4 (1)	0	0	0	0
30mg	12	21 (11)	8 (5)	0	0	0	0
100mg	6	5 (1)	4 (1)	0	0	0	0
300mg	29	47 (10)	20 (7)	1 (1)	1 (1)	0	0
1000mg	12	17 (4)	8 (4)	0	0	0	0
1500mg	6	8 (0)	3 (0)	0	1 (0)	0	0
2000mg	5	12 (2)	4 (1)	0	0	0	1 (1)

[0497] AE=不良事件;n=治疗相关或不相关的任何事件;(N)=研究者考虑的治疗。注:对于方案B0141006(安慰剂和300mg),由于其交叉性质,仅包括第一积极治疗阶段的数据

[0498] 在静脉内研究中,21.2%接受静脉内G1的受试者报告了治疗相关的不良事件(根据研究负责人可能与治疗有关的TRAE或AE),相比之下,仅17.7%接受安慰剂的受试者报告了该事件。在100mg G1或更高的剂量下,在22.4%的参与者中出现TRAE。在1,000mg或更高的剂量下,在21.7%的参与者中出现TRAE。抗体G1似乎与生命体征(收缩压和舒张压[BP]、温度和心率[HR])变化、心电图(ECG)异常(包括QTcB和QTcF)、输注部位反应的任何临床相关模式,或临床实验室发现无关。一名接受安慰剂的受试者中总胆红素提高1级(研究B0141001),以及一名接受安慰剂的受试者中ALT提高1级(研究B0141002)对肝功能测试(天冬氨酸氨基转移酶[AST]、丙氨酸氨基转移酶[ALT]、总胆红素和碱性磷酸酶)的效果有限。在接受任何研究剂量G1的受试者中未发现临床显著性肝功能异常。在评估肾脏功能、电解质的血液学测试中,或在尿液测试中,不存在G1和安慰剂之间的差异的证据。

[0499] 在静脉内/皮下研究(G1-SC-IV)中,皮下和静脉内递送途径之间的安全性和耐受性类似。平均心率和血压(舒张压和收缩压)不受抗体G1治疗的影响,在皮下施用抗体G1治疗后也未对任何心血管参数产生任何有意义的变化。在皮下研究期间观察到的TRAE汇总如下表12所示。

[0500] 表12

[0501]

	900mg (N=6)	225mg (N=6)	安慰剂 (N=6)
胃肠道疾病	2 (33.3%)	0	1 (16.7%)
CNS	0	1 (16.7%)	0
感染和侵染	0	0	0
骨骼肌和结缔组织	0	0	0
呼吸性	0	0	0

生殖和乳腺疾病	0	0	0
受伤	0	0	0
怀孕	0	0	0
肾脏	1 (16.7%)	0	0
血管	0	0	0

[0502] 在单剂量研究 (B0141001、B0141002、B0141006和B0141008) 中, 计算30mg至2,000mg范围的剂量的药代动力学(PK) 参数。组均终末半衰期($t_{1/2}$) 在大约40至48天的范围内。 C_{max} 和总暴露 (通过 AUC_{inf}) 评估) 随剂量的增加而增加。 AUC_{inf} 的增加似乎大致等于30和1,000mg之间的剂量比例, 并且似乎大于1,000和2,000mg之间的剂量比例。分布的体积很低, 在6-10L之间。

[0503] 在两个剂量研究 (B0141007) 中, 在第二剂量后, 表观终末半衰期在41和50天之间。血浆浓度在第二剂量后积聚, 积聚速率为大约1.5。此外, 在静脉内/皮下研究 (G1-SC-IV) 中, 与静脉内递送相比, 当皮下递送时, 药代动力学评估表明G1具有类似的终末半衰期。

[0504] 实施例17: 在抗体G1的临床研究中预防慢性偏头痛

[0505] 在患有慢性偏头痛的受试者中进行多中心、随机、双盲、双模拟、安慰剂控制、平行组、多剂量研究, 该研究将抗CGRP拮抗剂抗体G1与安慰剂进行比较。合格的受试者进入基线28天磨合期。在整个研究期间, 受试者可每天使用电子头痛日记系统收集其头痛和健康信息。在磨合期或研究期间, 偏头痛药物无变化。入选标准如下: (1) 年龄18至65岁的男性或女性; (2) 签署知情同意文件并注明日期, 表明受试者知晓该研究的所有相关方面, 包括任何已知和潜在的风险以及可用替代疗法; (3) 慢性偏头痛达到国际头痛疾病分类 (International Classification of Headache Disorders, ICHD-III β 版, 2013) 列出的诊断标准; (4) 在28天磨合期开始前, 如果剂量和方案稳定至少2个月, 受试者每天可使用最多两种不同的用于偏头痛的偏头痛预防性药物 (例如, 托吡酯、普萘洛尔、阿米替林), 或用于其它医学病症 (例如, 使用普萘洛尔治疗高血压); (5) 身体质量指数 (BMI) 为17.5至34.5kg/m², 总体重在50kg和120kg之间, 包括端值在内; (6) 如方法所定义受试者无生育能力, 或如果受试者具有生育能力, 且同意在研究的计划持续时间内保持禁欲或使用 (或其伴侣使用) 可接受的节育方法; (7) 在磨合期期间录入最少24/28天的头痛数据, 符合电子头痛日记规范 (85%符合)。上述 (3) 的慢性偏头痛诊断标准如下: (a) 筛选前频发性头痛的病史暗示慢性偏头痛 (15天/月) 持续至少三个月; (b) 头痛频率的检验通过将来收集的28天磨合期期间的基线信息实现, 这些信息显示在至少15天的头痛中, 至少8天/月满足以下标准中的任一者: (i) 确认为偏头痛发作, (ii) 有或伴有偏头痛前兆, 或 (iii) 通过麦角或曲坦衍生物减轻。

[0506] 排除标准要求受试者不满足以下条件中的任一者: (1) 慢性偏头痛在年龄大于50岁后发病; (2) 受试者在筛选前六个月期间接受奥那肉毒杆菌 (onabotulinum) 毒素A治疗偏头痛, 或出于任何医疗或美容原因, 需要在头部、脸部或颈部注射; (3) 受试者使用包含阿片类物质 (包括可待因) 或巴比妥类 (包括Fiorinal[®]、Fioracet[®]或任何其它包含布他比妥的组合) 的药物治疗偏头痛或出于任何其它原因每个月超过4天; (4) 在适当治疗试验后, 由于缺乏预防性治疗偶发性或慢性偏头痛的功效, >2种药物种类或>3种预防性药物 (在两种药物种类内) 无效; (5) 根据研究者的判断, 患有临床上显著的血液、肾脏、内分泌、肺部、胃肠、泌尿

生殖、神经或眼部疾病；(6) 受试者具有临床上显著的精神问题证据或病史，所述精神问题包括重度抑郁、恐慌症或泛焦虑症（根据Diagnostic and Statistical Manual, 第5版[DSM-5]的标准）；(7) 在筛选时，收缩压大于160mmHg或小于90mmHg；(8) 在筛选时，舒张压大于110mmHg或小于50mmHg；(9) 具有临床上显著的心血管疾病或血管缺血（诸如心肌、神经[例如，大脑缺血]、外周四肢缺血或其它缺血事件）病史；(10) 既往或目前具有癌症病史，基底细胞癌切除的那些受试者除外；(11) 孕妇或哺乳期女性；(12) 具有对注射蛋白质（包括单克隆抗体）的超敏反应史；(13) 在30天的研究入选期内使用研究药物治疗；(14) 临床上显著的基线12导程体表（12-lead surface）ECG异常，包括窦性停搏>2秒，二度或三度心传导阻滞或研究者判断为临床上显著的其它异常；(15) 在筛选时，基线12导程ECG显示，男性QTcF>450ms，女性470ms（如果QTcF超出这些值，则重复ECG，并且使用三次QTcF的平均值确定潜在受试者的资格；QTc使用Fridericia运算获得）；(16) 研究者判断为临床上显著异常的任何发现，包括血液学数值、血液化学、凝固测试或尿液分析（异常测试允许重复确认）；(17) 在重复测试中确认后，肝脏酶（丙氨酸氨基转移酶[ALT]、天冬氨酸氨基转移酶[AST]、碱性磷酸酶）>1.3倍正常值上限（ULN）；(18) 血清肌酸酐>1.5倍ULN、临床上显著的蛋白尿（尿试纸+4）或肾脏疾病的证据。

[0507] 在磨合期期间确认为患有慢性偏头痛并且与头痛日记高度符合的受试者在第2次就诊（第1天）时随机分配到三个治疗组之一。随机分配使用电子交互式网络响应系统进行。根据性别和基线偏头痛药物使用给受试者分级。每月（每28天）施用一次治疗，总共三次治疗超过3个月时期。治疗施用在第2次就诊（第1天；第一剂）、第3次就诊（第29天；第二剂）和第4次就诊（第57天；第三和最后剂）时给予。最后的研究退出评估在第三和最后剂后大约28天第5次就诊（第85天）时进行。注射为给以下组中的每个的受试者皮下施用超过3个月时期（每28天）：(1) 随机分配到900mg组的那些受试者每28天接受四次积极注射；(2) 随机分配到675/225mg组的那些受试者第一次治疗接受三次积极和一次安慰剂注射，第二和第三次治疗接受一次积极和三次安慰剂注射；(3) 随机分配到安慰剂组的那些受试者每28天接受四次安慰剂注射。积极注射包含225mg抗体G1。终点来源于电子头痛日记，电子头痛日记是记录上述24小时时期数据的网络交互式系统。总头痛持续时间以小时以及每个严重性水平的头痛小时数以数字记录。头痛严重性在预定时间点由受试者主观上评定：无疼痛、轻度疼痛、中度疼痛和重度疼痛。受试者还被要求记录在预定时间点是否存在以下相关症状：畏光、畏声、恶心和呕吐。另外的终点来源于在整个研究过程中监测研究受试者使用曲坦（例如，舒马曲坦）作为急性抗头痛药。在研究中受试者的处理和人口统计汇总提供于表9中。

[0508] 表9

[0509]

	安慰剂	675/225mg	900mg	总计
随机	89	88	87	264
完成	77 (86.5%)	72 (81.8%)	76 (87.4%)	225
以ITT分析	89 (100%)	87 (98.9%)	85 (97.7%)	261 (98.9%)
安全性分析	89 (100%)	88 (100%)	86 (98.9%)	263 (99.6%)
未完成	12 (13.5%)	16 (18.2%)	11 (12.6%)	39 (14.8%)
年龄 (平均年)	40.7	40	41.5	40.75
% 女性	85.4%	86.3%	86.2%	85.9%

偏头痛年数	20.4	15.8	18.7	18.3
-------	------	------	------	------

[0510] 在第1、2和3周(分别为W1、W2和W3)的每周,每个组的头痛小时数相对于基线的平均减少在图15中通过图形表示。结果显示,在W1、W2和W3的每周(包括每个第一周),相对于安慰剂组,两个治疗组均显著减少。

[0511] 在第1、2和3月(分别为M1、M2和M3)的每月,每个组的头痛小时数相对于基线的平均减少在图12中通过图形表示。结果显示,在全部三个时间点(包括第一剂后),相对于安慰剂组,两个治疗组均显著减少。对于图12的数据,相对于安慰剂组的统计显著性以所示p值提供。

[0512] 在基线和第2、3和4次就诊(分别为V2、V3和V4),每组的平均头痛小时数在如图13中通过图形表示。结果显示,在全部三个时间点(包括第一剂后),相对于安慰剂组,两个治疗组均显著减少。

[0513] 在第1、2和3月(分别为M1、M2和M3)的每月,每个组的中度或重度头痛天数相对于基线的平均减少在图14中表示。结果显示,在全部三个时间点(包括第一剂后),相对于安慰剂组,两个治疗组均具有统计学上显著性的减少。相对于安慰剂组的统计显著性以所示p值提供。

[0514] 在第1、2和3月(分别为M1、M2和M3)的每月,每个组的使用曲坦作为急救药物的次数相对于基线的平均减少在图16中通过图形表示。结果显示,在全部三个时间点(包括第一剂后),相对于安慰剂组,两个治疗组的曲坦使用均显著减少。相对于安慰剂组的统计显著性由图16所示的p值提供。

[0515] 相对于安慰剂组,在使用预防性药物(例如,托吡酯和阿米替林或普萘洛尔)的受试者中也观察到头痛小时数显著减少。

[0516] 两种剂量均具有良好的耐受性,且未出现安全性问题。治疗中出现的不良事件(TEAE)的按组汇总提供于表10中。相关TEAE的差异几乎可通过注射相关轻度事件(红斑、某些不适)完全解释。严重TEAE不涉及药物(无药物相关的不良事件)。

[0517] 表10

[0518]		安慰剂 N (%)	675/225mg N (%)	900mg N (%)
	TEAE	36 (40.4)	47 (53.4)	41 (47.7)
[0519]	相关 TEAE	15 (16.9)	25 (28.4)	28 (32.6)
	严重 TEAE	1 (1.1)	1 (1.1)	2 (2.3)
	TEAE 导致的终止	1 (1.1)	6 (6.8)	5 (5.8)
	死亡	0	0	0

[0520] 实施例18:在抗体G1的临床研究中高频率偶发性偏头痛的预防

[0521] 在患有高频率偶发性偏头痛(HFEM)的受试者中进行多中心、随机、双盲、安慰剂控制、平行组研究,该研究将抗CGRP抗体G1与安慰剂进行比较。研究设计按照实施例17,但具有两点不同。第一,根据The International Headache Society第二版(Olesen和Steiner 2004),对于经历高频率偏头痛、满足偶发性偏头痛标准的受试者的入选标准(3)为:(a)在筛选前头痛病史超过8天/月达至少3个月;(b)头痛频率的检验通过将来收集的28天磨合期期间的基线信息实现,这些信息显示在8至14天的头痛(任何类型)中,至少8天满足以下标准中的任一者:(i)偏头痛,(ii)可能偏头痛,或(iii)使用曲坦或麦角化合物。第二,给药计

划改为接受G1的组。特别地,注射为给以下组中的每个的受试者皮下施用超过3个月时期(每28天):(1)随机分配到675mg组的那些受试者每28天接受675mg G1;(2)随机分配到225mg组的那些受试者每28天接受225mg G1;以及(3)随机分配到安慰剂组的那些受试者每28天接受安慰剂注射。在研究中受试者的处理和人口统计汇总提供于表13中。研究的终点包括偏头痛天数减少和任何严重性头痛天数减少。

[0522] 表13

[0523]

	安慰剂	225mg	675mg	总计
随机	104	96	97	297
以ITT分析	104 (100%)	95 (99%)	96 (99%)	295 (99%)
安全性分析	104 (100%)	96 (100%)	97 (100%)	297 (100%)
年龄(平均年)	42.0	40.8	40.7	41.2
%女性	88%	91%	85%	88%
%白种人	82%	77%	76%	78%

[0524] 在第1、2和3月(分别为M1、M2和M3)的每月,每个组的偏头痛天数相对于基线的平均减少如图17所示。结果显示,在全部三个时间点(包括第一剂后),相对于安慰剂组,两个治疗组均具有统计学上显著性的减少。相对于安慰剂组的统计显著性以所示p值提供。

[0525] 在第1、2和3月(分别为M1、M2和M3)的每月,每个组的任何严重性头痛天数相对于基线的平均减少如图18所表示。结果显示,在全部三个时间点(包括第一剂后),相对于安慰剂组,两个治疗组均具有统计学上显著性的减少。相对于安慰剂组的统计显著性以所示p值提供。

[0526] 两种剂量均具有良好的耐受性,且未出现安全性问题。治疗中出现的不良事件(TEAE)的按组汇总提供于表14中。四种严重TEAE为由于一种腓骨骨折的情况,一种由于停药而发生颤动的情况,以及两种需要急救室(ER)治疗的偏头痛情况。

[0527] 表14

	安慰剂 N (%)	225mg N (%)	675mg N (%)
TEAE	58 (56)	44 (46)	57 (59)
相关 TEAE	24 (23%)	26 (27%)	24 (25%)
严重 TEAE	0	2 (2%)	2 (2%)
相关严重 TEAE	0	0	0
TEAE 导致的终止	0	4 (4%)	2 (2%)
死亡	0	0	0

[0528]

[0529] 实施例19:非临床安全性

[0530] 在食蟹猴中进行两个来评估抗体G1的安全性的研究。在第一研究中,评估单剂抗体G1的安全性。在第二研究中,评估重复剂量抗体G1的安全性。每个研究及其结果在下文进一步详细描述。对于单剂和重复剂量二者的研究,抗体G1配制为51.4mg/mL溶液:20mM组氨酸、84mg/mL海藻糖二水合物、0.2mg/mL聚山梨酸酯80、0.05mg/mL乙二胺四乙酸二钠二水合物和0.1mg/mL L-甲硫氨酸(pH约5.5)。无抗体G1的媒介物的配制方法相同。另外,在两个研究中,周期性地采集血样,以供使用经认证的ELISA方法进行抗体G1血浆浓度分析。

[0531] 首先使用GraphPad Prism(版本6.0)和Excel 2010(Microsoft)将数据汇集到汇总表格和图中。对于单次暴露研究,使用ANOVA分析遥测数据。使用SAS Release 8.2进行分

析。为了使R-R间期范围内的QT间期归一化,通过将每个RR间期与其相关QT间期关联来生成每个动物的单动物校正因子(IACF)。测定数据集的QT/RR间期关系的线性回归。将该线性回归的斜率用作所有治疗中相关动物的IACF。使用该IACF通过以下公式计算校正QT间期(QTc):

[0532] $QT-I(c) = \text{心率校正的QT间期} = QT-I - [(RR-300) * (IACF)]$ 。

[0533] 对于多剂量研究,还使用单因素方差分析来分析数据。如果ANOVA具有显著性($P < 0.05$),则使用Dunnett事后测试进行组间比较。对于每个性别,将处理组与对照(媒介物)组在5%双尾概率水平进行比较。

[0534] 单剂遥测研究

[0535] 用遥测计对八只成体雄性食蟹猴(Charles River Primates)进行外科仪器检测,并使其恢复至少两周。植入物(DSI TL11M2-D70-PCT)和接收器(RMC-1)由Data Sciences International制造。

[0536] 在给药前,使动物适应遥测数据采集笼至少过夜。在适应期间,进行血液动力学参数的研究前记录以检验传感器和设备功能正常。在遥测数据采集期间,将动物单独饲养于配备有遥测接收器的笼中。在非收集天,将动物饲养于无遥测接收器的笼中。将动物维持在12小时光照、12小时黑暗的昼夜循环,自由摄取水和经验证的灵长类饮食。

[0537] 对于研究的第一阶段,动物(8只雄性)仅施用媒介物,收集从约1小时给药前至22小时给药后的遥测数据。在媒介物施用后六天,相同的动物接受单次静脉内施用抗体G1(100mg/kg,剂量比食蟹猴的药理学EC50大约10倍)。再次连续记录所有动物的遥测心电图和血液动力学数据。此外,在接受单剂抗体G1后第3、7、10和14天监测这些动物约24小时。遥测ECG和血压信号通过植入的无线电遥测设备传输到安装在每个笼中的接收器。所采集的信号通过数据转换矩阵(DSI型号DEM)进入基于PC的数据采集系统(DSI软件Ponemah P3版本3.4);数据分析软件为Emka Technologies版本2.4.0.20(Emka Technologies)。类似物/数字取样速率为1,000Hz(遥测ECG数据)和500Hz(血压数据)。数据以1min平均值记录。

[0538] 在给药后第一天和随后几天内,抗体G1治疗之前和之后的组均收缩压(SBP)类似(在第3、7、10和14天遥测动物,时间间隔与第1天相同)。在给药后1-4小时,当抗体G1血液浓度为最大水平(4小时的平均浓度为3,500 μ g/mL)时,平均SBP为111mmHg,而媒介物施用后相同时间间隔为113mmHg。此外,在抗体G1施用后第3和7天的SBP为110mmHg,第10天为109mmHg,第14天为110mmHg。记录其它时间间隔的类似SBP数据。由于这是交叉设计研究,处理动物用作其本身的对照。与媒介物处理相比,当以抗体G1施用后的血压差异分析数据时,在第7、10和14天,后者时间间隔的SBP减少的统计学上显著性较小。

[0539] 在用抗体G1治疗后,记录的舒张压(DBP)比媒介物施用后获得的平均值小约3mmHg。从5-22小时,媒介物组和抗体G1组的组平均值相似。当测定的第一间隔出现DBP(范围为2.62-3.5mmHg)稍微减少时,也观察到其它天数的相同趋势,其中在第7-10天的7-22小时间隔偶尔观察到类似幅度的小变化。与所观察的DBP类似,相对于媒介物处理,在第一评估期间(1-4小时)观察到心率的少量下降。在中等评估期间,差异是不可检测的,并且在全天的18-22小时期间可再次观察到。

[0540] 此外,就ECG发现而言,相对于媒介物治疗,在任何时间点的QTc间隔变化均无统计学上显著性。虽然与媒介物相比,在14天时期可观察到RR、PR、RS和QT变化的统计学上显著

性,但它们的绝对值都很小。

[0541] 重复剂量安全性研究

[0542] 重复剂量安全性研究包括48只成体、性别匹配(每组每种性别6只)的、未暴露于抗体G1的食蟹猴(Charles River Primates)。动物接受每周一次静脉内注射媒介物或抗体G1达14周,剂量为10mg/kg、100mg/kg或300mg/kg。在每组中,给药结束后,允许每种性别的两只动物恢复另外的4个月。

[0543] 在研究前阶段记录ECG和血压测定值一次,在稳定状态后实现两次测定(第85天给药前和给药后4小时),并在给药结束后(恢复期的第103天)约1周一次。使用开他敏麻醉动物,并且使用八导程记录ECG。使用Life Science Suite Ponemah Physiology Platform软件系统,通过DSI,使用导程I、II、aVF、CG4RL和CV4LL作为标准,利用捕获的数据进行ECG(包括心率)测定。QT间期(QTc)的心率校正使用Bazett公式计算。

[0544] 在第一剂前、给药12周后(13剂)以及给药结束后大约1周记录血压。相对于媒介物治疗动物,未记录到任何治疗组动物的SBP或DBP的显著变化。剂量组和测定时间点之间的组均心率相对一致,未测定到统计差异。在给药的第一个周期期间以及评估血压和ECG时测定抗体G1的血浆浓度,显示每周重复给药具有积聚作用。

[0545] 此外,就ECG发现而言,所有剂量和时间点之间的QTc间隔无显著性差异。另外,对于研究过程中评估的任何ECG参数,未观察到显著的或相关的ECG变化。

[0546] 概括地说,抗体G1在两个研究中均具有非常好的耐受性,既未记录到任何血液动力学参数的临床上显著的变化,也未记录到任何ECG参数的任何相关变化。在食蟹猴中,心血管和血液动力学参数似乎未受到抗体G1长期抑制CGRP的影响。

[0547] 应当理解,本文所述的实施例和实施方案仅出于示意性目的,并且对其进行的各种修改或更改将对本领域的技术人员构成建议,并且包括在本专利申请的精神和范围内。本文引用的所有公布、专利和专利申请就所有目的而言据此全文以引用方式并入,以达到如同具体地和单独地表明,每个单独的公布、专利或专利申请以引用方式并入的相同程度。

[0548] 生物材料的保藏

[0549] 以下材料保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),学院大道(University Boulevard)10801号,马纳萨斯,弗吉尼亚州20110-2209,美国(ATCC):

	材料	抗体编号	ATCC 登录号	保藏日期
[0550]	pDb.CGRP.hFcGI	G1 重链	PTA-6867	2005 年 7 月 15 日
	pEb.CGRP.hKGI	G1 轻链	PTA-6866	2005 年 7 月 15 日

[0551] 载体pEb.CGRP.hKGI是编码G1轻链可变区和轻链κ恒定区的多核苷酸;载体pDb.CGRP.hFcGI是编码包含以下突变的G1重链可变区和重链IgG2恒定区的多核苷酸:A330P331至S330S331(氨基酸编号参考野生型IgG2序列;参见Eur.J.Immunol.(1999)29:2613-2624)。

[0552] 这些保藏物依据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约及其实施细则(Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder)(《布达佩斯条约》,Budapest Treaty)的规定制备。这确保了保藏物从保藏日期起维持存活培养30年。ATCC依据《布达佩斯条约》的条款确保保藏物的可获取性,并且受

到Rinat Neuroscience Corp.和ATCC之间的协议约束,这确保了在相关美国专利发布时或任何美国或外国专利申请公开时,先到为准,公众可永久和无限限制获取保藏物的培养子代,并且确保了根据35USC Section 122以及依据其的专员规则(包括37CFR Section 1.14,特别涉及8860G 638)享有权利的美国专利及商标专员指定的人员可获取子代。

[0553] 本专利申请的受让人同意,如果保藏材料的培养物在合适的条件下培养时将要死亡或遗失或损坏,则在接到通知时将材料迅速更换为相同的另外材料。保藏材料的可获取性不应解释为在违背任何政府机构根据其专利法授予的权力情况下实践本发明的许可。

[0554] 抗体序列

[0555] G1重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSES

[0556] DASATHYAEAVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNY
WGQGTLVTVSS

[0557] G1轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYL

[0558] GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIK

[0559] G1CDR H1 (延伸CDR) (SEQ ID NO:3)

[0560] GFTFSNYWIS

[0561] G1CDR H2 (延伸CDR) (SEQ ID NO:4)

[0562] EIRSESDASATHYAEAVKG

G1 CDR H3 (SEQ ID NO:5)

YFDYGLAIQNY

G1 CDR L1 (SEQ ID NO:6)

KASKRVTTYVS

[0563] G1 CDR L2 (SEQ ID NO:7)

GASNRYL

G1 CDR L3 (SEQ ID NO:8)

SQSYNYPYT

[0564] G1重链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO:9)

GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCCT

GCGTCTGTCTGCGCTGCTTCCGGTTTCACCTTCTCCAACACTGGATCTCCTG

GGTTCGTCAGGCTCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCG

[0565] AATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTAAAGGTCGTTTCACCA

TCTCCCGTGACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTG

CTGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGTCTGGCTA

TCCAGAACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCCTCC

[0566] G1轻链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO:10)

- [0567] GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCCAGGTGAACGTG
CTACCCTGTCTGCAAAGCTTCCAAACGGGTACCACCTACGTTTCCTGGTACCAG
CAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCGTCTGCTGATCTACGGTGCTTCCAACCGTTACCT
CGGTATCCCAGCTCGTTTCTCCGGTTCCGGTCCGGTACCGACTTCACCCTGACCA
TCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTCAGTCCTACAAC
TACCCCTACACCTTCGGTCAGGGTACCAAACCTGGAAATCAAA
- [0568] G1重链全抗体氨基酸序列(包括本文所述的经修饰的IgG2) (SEQ ID NO:11)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSES
DASATHYAEAVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNY
WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVR
- [0569] KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK
- [0570] G1轻链全抗体氨基酸序列(SEQ ID NO:12)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYL
- [0571] GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0572] G1重链全抗体核苷酸序列(包括本文所述的经修饰的IgG2) (SEQ ID NO:13)

[0573]

GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCT
GCGTCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGTTTCACCTTCTCCAACTACTGGATCTCCTG
GGTTCGTCAGGCTCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGCTGAAATCCGTTCCG
AATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTTAAAGGTGTTTTACCA
TCTCCCGTGACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTG
CTGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGTCTGGCTA
TCCAGAACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCCTCCGCCTCCACC
AAGGGCCCATCTGTCTTCCCACTGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAG
CACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCTGTGACCG
TGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAGCTGTC
CTGCAGTCCTCAGGTCTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAG
CAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAACA
CCAAGGTCGACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGTGTGTGGAGTGTCCACCTTGT
CCAGCCCCCTCCAGTGGCCGGACCATCCGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAGCCAAA
GGACACCCTGATGATCTCCAGAACCCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGACG
TGTCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAG
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTTCAG
AGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAG
TATAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGCATCGAGAAGACCATC
TCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATACCCTGCCCCCATC
CAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGAT
TCTATCCATCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGAGAAC
AACTATAAGACCACCCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGATCCTTCTTCCTGTAT
TCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCTTG
TTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGAGCCTGTCCC
TGTCTCCAGGAAAGTAA

[0574] G1轻链全抗体核苷酸序列 (SEQ ID NO:14)

GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCAGGTGAACG
TGCTACCCTGTCTGCAAAGCTTCCAAACGGGTACCACCTACGTTTCCTGGTA
CCAGCAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCGTCTGCTGATCTACGGTGCTTCCAACC
GTTACCTCGGTATCCCAGCTCGTTTCTCCGGTTCCGGTCCGGTACCGACTTCA
CCCTGACCATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTC
AGTCCTACAATAACCCCTACACCTTCGGTACAGGTACCAAACCTGGAAATCAAAC
GCACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCCGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCGCGCGAGG
CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAG
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCT
GACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA
CCCATCAGGGCCTGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGC
TAA

[0576] 人和大鼠CGRP的氨基酸序列比较 (人 α -CGRP (SEQ ID NO:15); 人 β -CGRP (SEQ ID

N0:43);大鼠 α -CGRP (SEQ ID N0:41);和大鼠 β -CGRP (SEQ ID N0:44)):

NH₂-ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (人 α -CGRP)

[0577] NH₂-ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKSNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (人 β -CGRP)

NH₂-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSEAF-CONH₂ (大鼠 α -CGRP)

NH₂-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (大鼠 β -CGRP)

[0578] 轻链可变区LCVR17氨基酸序列 (SEQ ID N0:58)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSEYHS
GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQGDALPPTFGQGTKLEIK

[0580] 重链可变区HCVR22氨基酸序列 (SEQ ID N0:59)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE
GTGDTTRYIQKFAGRVMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARLSDYVSGFSY
WGQGTLLTVSS

[0582] 轻链可变区LCVR18氨基酸序列 (SEQ ID N0:60)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSEYHS
GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQGDALPPTFGQGTKLEIK

[0584] 重链可变区HCVR23氨基酸序列 (SEQ ID N0:61)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE
GTGKTVYIQKFAGRVMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARLSDYVSGFSY
WGQGTLLTVSS

[0586] 轻链可变区LCVR19氨基酸序列 (SEQ ID N0:62)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKDISKYNWYQQKPGKAPKLLIYTSYHSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGDALPPTFGGGTKVEIK

[0588] 重链可变区HCVR24氨基酸序列 (SEQ ID N0:63)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFGNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE
GTGKTVYIQKFADRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSDYVSGFGYW
GQGTITVTVSS

[0590] 轻链可变区LCVR20氨基酸序列 (SEQ ID N0:64)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIDKYNWYQQKPGKAPKLLIYTSEYHSG
VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQGDALPPTFGQGTKLEIK

[0592] 重链可变区HCVR25氨基酸序列 (SEQ ID N0:65)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE
GTGKTVYIQKFAGRVMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARLSDYVSGFGY
WGQGTLLTVSS

[0594] 轻链可变区LCVR21氨基酸序列 (SEQ ID N0:66)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDKYNWYQQKPGKAPKLLIYTSYHSG
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGDALPPTFGGGTKVEIK

[0596] 重链可变区HCVR26氨基酸序列 (SEQ ID N0:67)

- QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFGNVWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE
[0597] GTGKTVYIQKFAGRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLSDYVSGFGYW
GQGTTVTVSS
- [0598] 轻链可变区LCVR27氨基酸序列 (SEQ ID NO:68)
QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGKVPKQLIYDASTLA
- [0599] SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIK
R
- [0600] 重链可变区HCVR28氨基酸序列 (SEQ ID NO:69)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWVGIVING
- [0601] ATYYASWAKGRFTISRDNSTTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTS
S
- [0602] 轻链可变区LCVR29氨基酸序列 (SEQ ID NO:70)
QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLA
- [0603] SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCFVFGGGTKVEIK
R
- [0604] 重链可变区HCVR30氨基酸序列 (SEQ ID NO:71)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIVIN
- [0605] DNTYYASWAKGRFTISRDNSTTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVT
SS
- [0606] 轻链可变区LCVR31氨基酸序列 (SEQ ID NO:72)
QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLA
- [0607] SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCFVFGGGTKVEIK
R
- [0608] 重链可变区HCVR32氨基酸序列 (SEQ ID NO:73)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIVIN
- [0609] DNTYYASWAKGRFTISRDNSTTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVT
SS
- [0610] 轻链可变区LCVR33氨基酸序列 (SEQ ID NO:74)
QVLTQTSPVSAAVGSTVTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGQPPKQLIYDASTLA
- [0611] SGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCNDAAAYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTEVVV
KR
- [0612] 重链可变区HCVR34氨基酸序列 (SEQ ID NO:75)
QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCSVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWIGVIGINGAT
- [0613] YYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARGDIWGPGTLTVSS
- [0614] 轻链可变区LCVR35氨基酸序列 (SEQ ID NO:76)
QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGKVPKQLIYDASTLA
- [0615] SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIK
R
- [0616] 重链可变区HCVR36氨基酸序列 (SEQ ID NO:77)

- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSIGIDLSGYIMNWVRQAPGKGLEWVGIVIGING
[0617] ATYYASWAKGRFTISRDNSTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTS
S
- [0618] 轻链可变区LCVR37氨基酸序列 (SEQ ID NO:78)
QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRP
[0619] SGIPDRFSGSKSGTSTTLGITGLQTGDEADYYCGTWDSRLSAVVFGGGTLTVL
- [0620] 重链可变区HCVR38氨基酸序列 (SEQ ID NO:79)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAVISFD
[0621] GSIKYSVDSVKGRFTISRDNSTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLNYYDSSGYY
HYKYYGMAVWGQGTTVTVSS

序列表

<110> 泰华制药国际有限公司

<120> 针对降钙素基因相关肽的拮抗剂抗体及其使用方法

<130> 43612-0006W01

<140> PCT/US2015/021887

<141> 2015-03-20

<150> 62/119,778

<151> 2015-02-23

<150> 62/083,809

<151> 2014-11-24

<150> 61/968,897

<151> 2014-03-21

<160> 79

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Ser Glu Ser Asp Ala Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60

Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Leu Ala Tyr Phe Asp Tyr Gly Leu Ala Ile Gln Asn Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 2

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Lys	Arg	Val	Thr	Thr	Tyr
			20					25					30		
Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Leu	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65				70					75					80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 3

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	Trp	Ile	Ser
1				5				10	

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 4

Glu Ile Arg Ser Glu Ser Asp Ala Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu Ala

1

5

10

15

Val Lys Gly

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 5

Tyr Phe Asp Tyr Gly Leu Ala Ile Gln Asn Tyr

1

5

10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 6

Lys Ala Ser Lys Arg Val Thr Thr Tyr Val Ser

1

5

10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 7

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Leu

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 8

Ser Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 9

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 9

gaagttcagc tggttgaatc cgggtggtggt ctggttcagc caggtgggtc cctgcgtctg 60
tctcgcgtg cttccggttt caccttctcc aactactgga tctcctgggt tcgtcaggct 120
cctggtaaag gtctggaatg ggttgctgaa atccgttccg aatccgacgc gtccgctacc 180
cattacgctg aagctgttaa aggtcgtttc accatctccc gtgacaacgc taagaactcc 240
ctgtacctgc agatgaactc cctgcgtgct gaagacaccg ctgtttacta ctgcctggct 300
tactttgact acggtctggc tatccagaac tactggggtc agggtaccct ggttaccggt 360
tcctcc 366

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 10

gaaatcggtc tgaccacgac cccggctacc ctgtccctgt ccccagggtga acgtgctacc 60
ctgtcctgca aagcttccaa acgggttacc acctacgttt cctgggtacca gcagaaaccc 120
ggtcaggctc ctcgtctgct gatctacggg gtttccaacc gttacctcgg tatcccagct 180
cgttttctccg gttccgggtc cggtagcgac ttcacctga ccatctctc cctggaaccc 240
gaagacttcg ctgtttacta ctgcagtcag tctacaact accctacac cttcgggtcag 300
ggtaccaaac tggaaatcaa a 321

<210> 11

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 11

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	20	25	30	
Trp	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ala	Glu	Ile	Arg	Ser	Glu	Ser	Asp	Ala	Ser	Ala	Thr	His	Tyr	Ala	Glu	50	55	60	
Ala	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	65	70	75	80
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	85	90	95	
Tyr	Cys	Leu	Ala	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Gly	Leu	Ala	Ile	Gln	Asn	Tyr	Trp	100	105	110	
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	115	120	125	
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	130	135	140	
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155	160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	180	185	190	
Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	195	200	205	
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	210	215	220	
Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	225	230	235	240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	245	250	255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	260	265	270	
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	275	280	285	

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr			
	325	330	335
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
	340	345	350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
	355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
	370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	435	440	445
<210> 12			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic			
polypeptide			
<400> 12			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Lys Arg Val Thr Thr Tyr			
	20	25	30
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Leu Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr			

	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			

<210> 13

<211> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 13

```

gaagttcagc tggttgaatc cgggtgggtggt ctggttcagc caggtgggttc cctgcgtctg 60
tcctgcgctg cttccggttt caccttctcc aactactgga tctcctgggt tcgtcaggct 120
cctggtaaag gtctggaatg ggttgctgaa atccgttccg aatccgacgc gtccgctacc 180
cattacgctg aagctgttaa aggtcgtttc accatctccc gtgacaacgc taagaactcc 240
ctgtacctgc agatgaactc cctgcgtgct gaagacaccg ctgtttacta ctgcctggct 300
tactttgact acggtctggc tatccagaac tactgggggc aggggtaccct ggttaccgtt 360
tcctccgcct ccaccaaggg cccatctgtc tteccactgg ccccatgctc ccgcagcacc 420
tccgagagca cagccgccct gggtgcctg gtcaaggact acttcccaga acctgtgacc 480
gtgtcctgga actctggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ctttcccagc tgtcctgcag 540
tcctcaggtc tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc catccagcaa ctteggcacc 600
cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag ccaagcaaca ccaaggtcga caagaccgtg 660
gagagaaagt gttgtgtgga gtgtccacct tgtccagccc ctccagtggc cggaccatcc 720
gtgttcctgt tccctccaaa gccaaaggac accctgatga tctccagaac cccagaggtg 780
acctgtgtgg tgggtggacgt gtcccacgag gaccagagg tgcagttcaa ctggtatgtg 840

```

gacggagtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagccaagag aggagcagtt caactccacc 900
 ttcagagtgg tgagcgtgct gaccgtgggtg caccaggact ggctgaacgg aaaggagtat 960
 aagtgttaagg tgtccaacaa gggactgcca tccagcatcg agaagacat ctccaagacc 1020
 aagggacagc caagagagcc acaggtgtat accctgcccc catccagaga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctgggtg aagggattct atccatccga catcgccgtg 1140
 gagtgggagt ccaacggaca gccagagaac aactataaga ccacccctcc aatgctggac 1200
 tccgacggat ccttcttcct gtattccaag ctgaccgtgg acaagtccag atggcagcag 1260
 ggaaacgtgt tctcttggtc cgtgatgcac gaggcctgc acaaccacta taccagaag 1320
 agcctgtccc tgtctccagg aaagtaa 1347

<210> 14

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 14

gaaatcggtc tgaccagtc cccggctacc ctgtccctgt ccccaggtga acgtgctacc 60
 ctgtcctgca aagcttccaa acgggttacc acctacgttt cctggtacca gcagaaaccc 120
 ggtcaggctc ctcgtctgct gatctacggt gttccaacc gttacctcg tateccagct 180
 cgtttctccg gttccggtc cggtagcgac ttcacctga ccattctctc cctggaaccc 240
 gaagacttcg ctgtttacta ctgcagtcag tctacaact accctacac cttegggtcag 300
 ggtaccaaac tggaaatcaa acgcactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctccctcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc cggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 ccgcgcgagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgcc tccaatccgg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagttctc cagtcacaaa gagcttcaac cgcggtgagt gctaa 645

<210> 15

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 15

Ala Cys Asp Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu

1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val

20 25 30

Gly Ser Lys Ala Phe

35

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 16

Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu Ser Arg Ser Gly Gly Val Val

1 5 10 15

Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe

20 25 30

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 17

Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser

1 5 10 15

Lys Ala Phe

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 18

Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Ala Thr Asn Val Gly Ser

1 5 10 15

Lys Ala Phe

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 19

Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser

1 5 10 15

Ala Ala Phe

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 20

Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser

1 5 10 15

Glu Ala Phe

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 21

Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser

1 5 10 15

Met Ala Phe

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 22

Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser

1 5 10 15

Gln Ala Phe

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 23

Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser

1

5

10

15

Lys Ala Ala

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 24

Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe Ala

1

5

10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 25

Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe

1

5

10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 26

Asn Asn Ala Val Pro Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe

1

5

10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 27

Asn Asn Phe Ala Pro Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe
1 5 10
<210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> C-term amidated
<400> 28
Asn Asn Phe Val Ala Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe
1 5 10
<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> C-term amidated
<400> 29
Asn Asn Phe Val Pro Ala Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe
1 5 10
<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> C-term amidated
<400> 30
Asn Asn Phe Val Pro Thr Ala Val Gly Ser Lys Ala Phe
1 5 10
<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> C-term amidated
<400> 31
Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Ala Gly Ser Lys Ala Phe
1 5 10
<210> 32

<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> C-term amidated
<400> 32
Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Ala Ser Lys Ala Phe
1 5 10
<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> C-term amidated
<400> 33
Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ala Lys Ala Phe
1 5 10
<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> C-term amidated
<400> 34
Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala Ala
1 5 10
<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> C-term amidated
<400> 35
Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe
1 5 10
<210> 36
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser
1 5 10 15

Lys Ala Phe

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser
1 5 10 15

Lys Ala

<210> 38

<211> 36

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Ala Cys Asp Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Lys Ala
35

<210> 39

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ala Cys Asp Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
1 5 10 15

Ser Arg Ser

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Ala Cys Asp Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala
1 5 10

<210> 41

<211> 37

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<220>

<223> C-term amidated

<400> 41

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu

1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asp Asn Phe Val Pro Thr Asn Val

20 25 30

Gly Ser Glu Ala Phe

35

<210> 42

<211> 19

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<220>

<223> C-term amidated

<400> 42

Ser Gly Gly Val Val Lys Asp Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser

1 5 10 15

Glu Ala Phe

<210> 43

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 43

Ala Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu

1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Gly Met Val Lys Ser Asn Phe Val Pro Thr Asn Val

20 25 30

Gly Ser Lys Ala Phe

35

<210> 44

<211> 37

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<220>

<223> C-term amidated

<400> 44

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu

1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asp Asn Phe Val Pro Thr Asn Val

20 25 30

Gly Ser Lys Ala Phe

35

<210> 45

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 45

Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe

1 5 10 15

Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro

20 25 30

<210> 46

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 46

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val

20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr

35

<210> 47

<211> 52

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> C-term amidated

<400> 47

Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys

1 5 10 15

Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln

20 25 30

Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser

35 40 45

Pro Gln Gly Tyr

50

<210> 48

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 48

Glu Leu Leu Gly

1

<210> 49

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 49

Glu Leu Leu Gly

1

<210> 50

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 50

Pro Val Ala

1

<210> 51
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 51
Glu Leu Leu
1
<210> 52
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 52
Glu Phe Leu Gly
1
<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (5)
<223> Arg, Trp, Gly, Leu or Asn
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) .. (7)
<223> Thr, Ala, Asp, Gly, Arg, Ser, Trp or Val
<400> 53
Lys Ala Ser Lys Xaa Val Xaa Thr Tyr Val Ser
1 5 10
<210> 54

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) .. (1)
<223> Gly or Ala
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2) .. (2)
<223> Ala or His
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) .. (7)
<223> Leu, Thr, Ile or Ser
<400> 54
Xaa Xaa Ser Asn Arg Tyr Xaa
1 5
<210> 55
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (5)
<223> Glu, Arg, Lys, Gln or Asn
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8) .. (8)
<223> Ala, Gly, Asn, Glu, His, Ser, Leu, Arg, Cys, Phe, Tyr, Val,
Asp or Pro
<220>
<221> MOD_RES

<222> (9) .. (9)
<223> Ser, Gly, Thr, Tyr, Cys, Glu, Leu, Ala, Pro, Ile, Asn, Arg, Val, Asp or Met
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12) .. (12)
<223> His or Phe
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15) .. (15)
<223> Glu or Asp
<400> 55
Glu Ile Arg Ser Xaa Ser Asp Xaa Xaa Ala Thr Xaa Tyr Ala Xaa Ala
1 5 10 15
Val Lys Gly
<210> 56
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
6xHis tag
<400> 56
His His His His His His
1 5
<210> 57
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 57
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 58
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 58

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asp	Asn	Tyr
		20						25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Tyr	Thr	Ser	Glu	Tyr	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asp	Ala	Leu	Pro	Pro
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
				100					105						

<210> 59

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 59

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5				10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Gly	Asn	Tyr
		20						25					30		
Trp	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Ala	Ile	Tyr	Glu	Gly	Thr	Gly	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ile	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Ala	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Leu	Ser	Asp	Tyr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly

100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 60		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide		
<400> 60		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1 5 10 15		
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asn Tyr		
20 25 30		
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35 40 45		
Tyr Tyr Thr Ser Glu Tyr His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50 55 60		
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65 70 75 80		
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asp Ala Leu Pro Pro		
85 90 95		
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100 105		
<210> 61		
<211> 119		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide		
<400> 61		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Asn Tyr		
20 25 30		
Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35 40 45		

Gly Ala Ile Tyr Glu Gly Thr Gly Lys Thr Val Tyr Ile Gln Lys Phe
 50 55 60
 Ala Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Ser Asp Tyr Val Ser Gly Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 62

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 62

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Gly Tyr His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asp Ala Leu Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 63

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 63

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Glu Gly Thr Gly Lys Thr Val Tyr Ile Gln Lys Phe
 50 55 60
 Ala Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Ser Asp Tyr Val Ser Gly Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 64

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 64

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Asp Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Glu Tyr His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asp Ala Leu Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 65

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 65

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Gly	Asn	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40					45			
Gly	Ala	Ile	Tyr	Glu	Gly	Thr	Gly	Lys	Thr	Val	Tyr	Ile	Gln	Lys	Phe
		50				55				60					
Ala	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90					95		
Ala	Arg	Leu	Ser	Asp	Tyr	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									

<210> 66

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 66

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asp	Lys	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Tyr	Thr	Ser	Gly	Tyr	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asp Ala Leu Pro Pro		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	

<210> 67

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 67

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Asn Tyr		
20	25	30
Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Ala Ile Tyr Glu Gly Thr Gly Lys Thr Val Tyr Ile Gln Lys Phe		
50	55	60
Ala Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Leu Ser Asp Tyr Val Ser Gly Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115		

<210> 68

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 68

Gln Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr His Asn Thr
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Gln Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Asp Cys Thr
 85 90 95
 Asn Gly Asp Cys Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 69

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 69

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Val Ile Gly Ile Asn Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 70

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 70

Gln	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp
1				5					10					15	
Arg	Val	Thr	Ile	Asn	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Tyr	Asp	Asn	Asn
				20					25					30	
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Gln	Leu
				35					40					45	
Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
				50					55					60	
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65									70					75	
Pro	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Cys	Ser
				85					90					95	
Ser	Gly	Asp	Cys	Phe	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				100					105					110	

Arg

<210> 71

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 71

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5						10				15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Asp	Leu	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30	
Tyr	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				35					40					45	
Gly	Val	Ile	Gly	Ile	Asn	Asp	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys
				50					55					60	
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Thr	Thr	Val	Tyr	Leu
65															
				70					75					80	

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 72

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 72

Gln Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asp Asn Asn
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Gln Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Asp Cys Ser
 85 90 95

Ser Gly Asp Cys Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 73

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 73

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Leu Asp Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Val Ile Gly Ile Asn Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 74

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 74

Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Ser
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr His Asn Thr
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Gln Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln
 65 70 75 80
 Cys Asn Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Asp Cys Thr
 85 90 95
 Asn Gly Asp Cys Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

Arg

<210> 75

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 75

Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Pro
1				5				10						15	
Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Ser	Gly	Tyr	Tyr
			20					25						30	
Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
			35					40						45	
Val	Ile	Gly	Ile	Asn	Gly	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys	Gly
		50					55					60			
Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Leu	Lys	Met
65					70					75					80
Thr	Ser	Leu	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gly
					85					90					95
Asp	Ile	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
			100					105							

<210> 76

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 76

Gln	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp
1				5					10					15	
Arg	Val	Thr	Ile	Asn	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Tyr	His	Asn	Thr
			20						25					30	
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Gln	Leu
			35						40					45	
Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
		50					55					60			
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65						70					75				80
Pro	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Cys	Thr
					85					90					95
Asn	Gly	Asp	Cys	Phe	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100						105					110	

Arg

<210> 77

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 77

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Ser	Gly	Tyr
			20					25				30			
Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Gly	Val	Ile	Gly	Ile	Asn	Gly	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys
	50					55				60					
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Thr	Thr	Val	Tyr	Leu
65				70				75					80		
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala
				85				90				95			
Arg	Gly	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
			100					105				110			

<210> 78

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 78

Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Gly	Gln
1				5				10					15		
Lys	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Asn	Asn
			20					25				30			
Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
		35				40					45				
Ile	Tyr	Asp	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55				60					
Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Thr	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln

65	70	75	80
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Arg Leu			
	85	90	95
Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
	100	105	110
<210> 79			
<211> 130			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide			
<400> 79			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe			
	20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Ser Val Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Asp Arg Leu Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Tyr			
	100	105	110
Lys Tyr Tyr Gly Met Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val			
	115	120	125
Ser Ser			
130			

Fab	K _D (nM) 1-37 (WT)	K _D (nM) 19-37 ^a	K _D (nM) 25-37 ^b	K _n (突变体/亲本)											
				P27A	V28A	P29A	T30A	N31A	V32A	G33A	S34A	K35A	F37A		
7E9	1.0	1.1±0.8	0.14±0.05	1.0	1.0	26	7	9	41	1256	69	4	3598		
8B6	1.1	1.5±1.2	0.45±0.08	1.0	1.0	9	2.2	3	5	496	26	3	2527		
10A8	2.1	2.4±1.4	1.6±0.2	1.0	1.0	9	4	4	11	36	82	13	2152		
7D11	4.4	10±7	3.4±0.4	1.1	1.0	7	4	5	5	86	18	1.4	430		
6H2	9.3	7.8±0.2	8.5±0.5	0.9	1.0	1.0	0.8	4	11	14	0.5	1.0			
4901	60.5	52±12	296±115	0.8	0.8	0.2	0.2	0.3	0.9	1.3	0.8	0.3			
14E10	79.7	91±3	117.4±0.7	0.8	0.8	11	3	18	2	1	3	0.4 ^b			
9B8	84.7	76±20	96±28	0.8	0.8	0.6	0.6	0.7	0.6	1.3	4	0.4 ^b			
13C2	94.4	86±13	137±5	0.7	0.7	0.5	0.4	0.6	0.2	0.9	1.1	0.4 ^b			
14A9	148.4	219±114	246±20	0.8	0.7	0.7	0.5	0.8	0.7	1.6	1.3	6			
6D5	209.9	207±26	378±22	0.8	0.7	0.5	0.4	0.6	0.5	3	1.1	5			
1C5	296.4	223±51	430±173	0.8	0.8	0.6	0.4	0.6	0.6	1.1	1.1	5			

图1

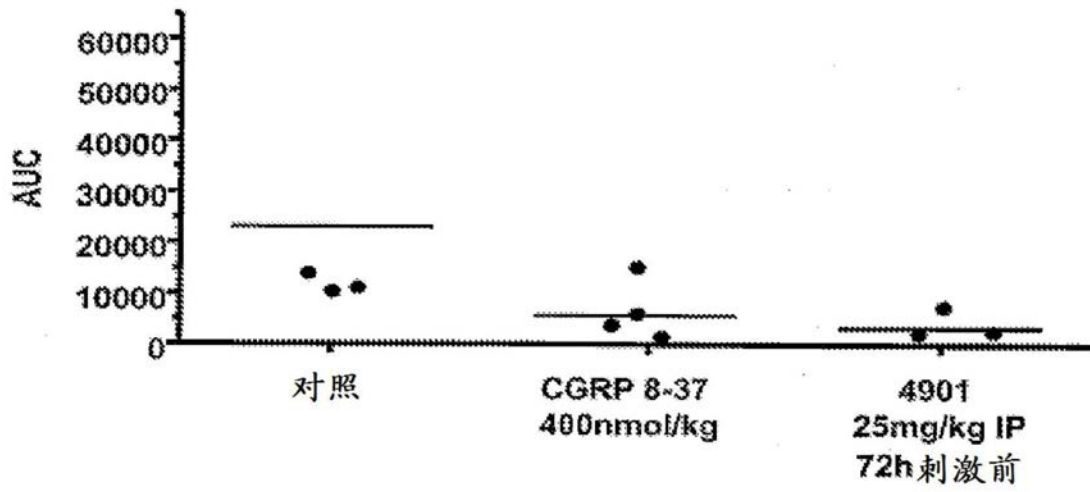


图2A

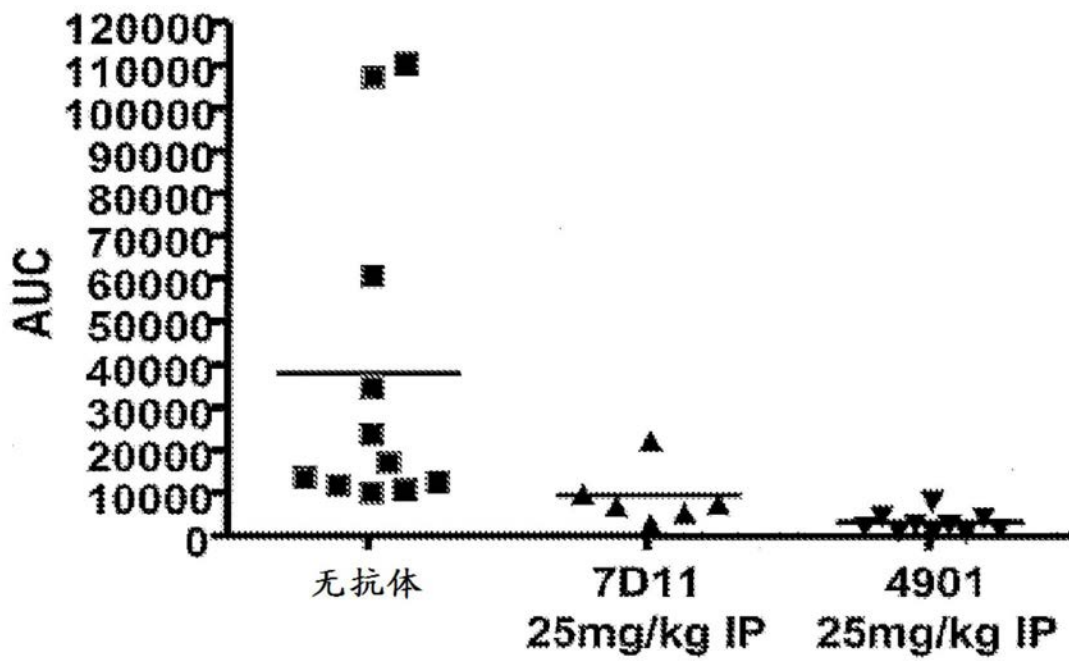


图2B

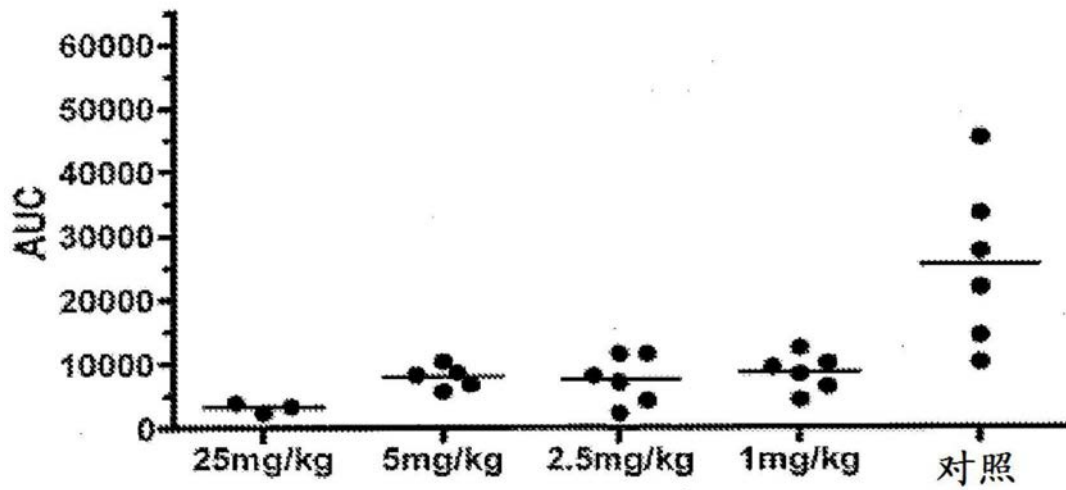


图3

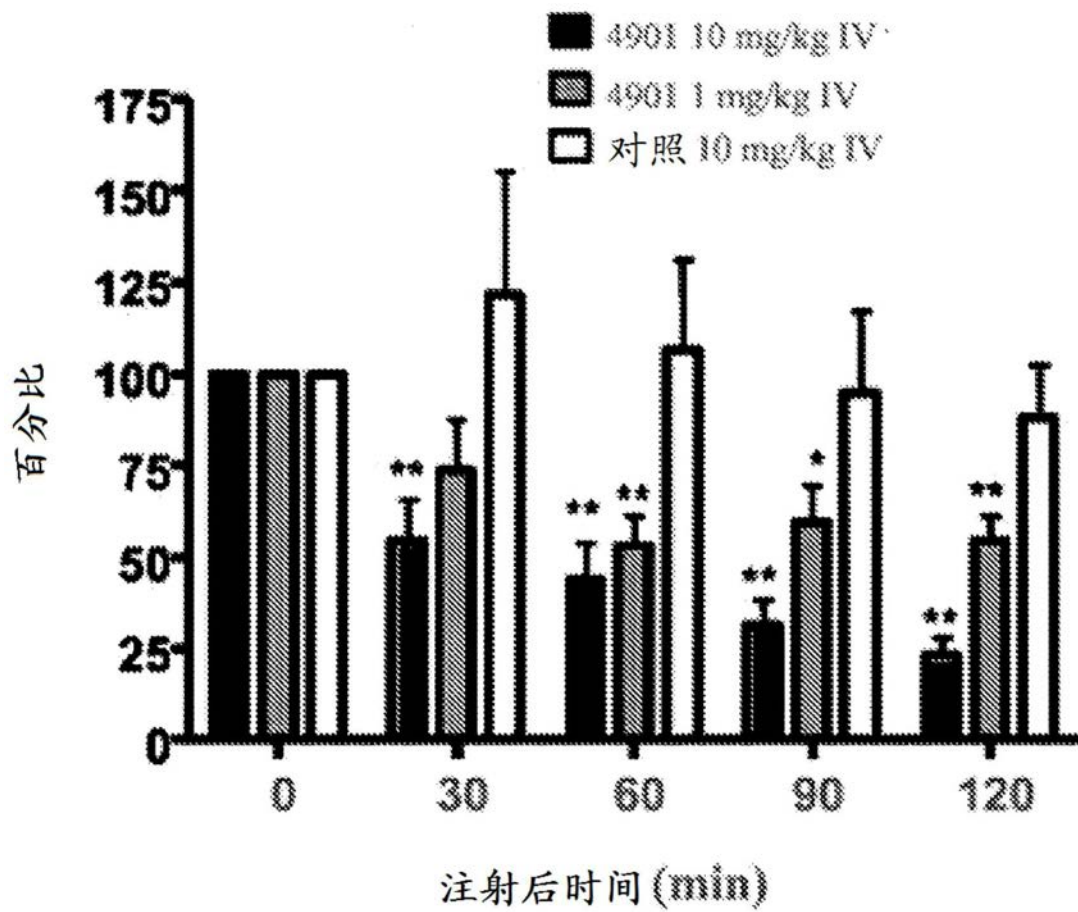


图4A

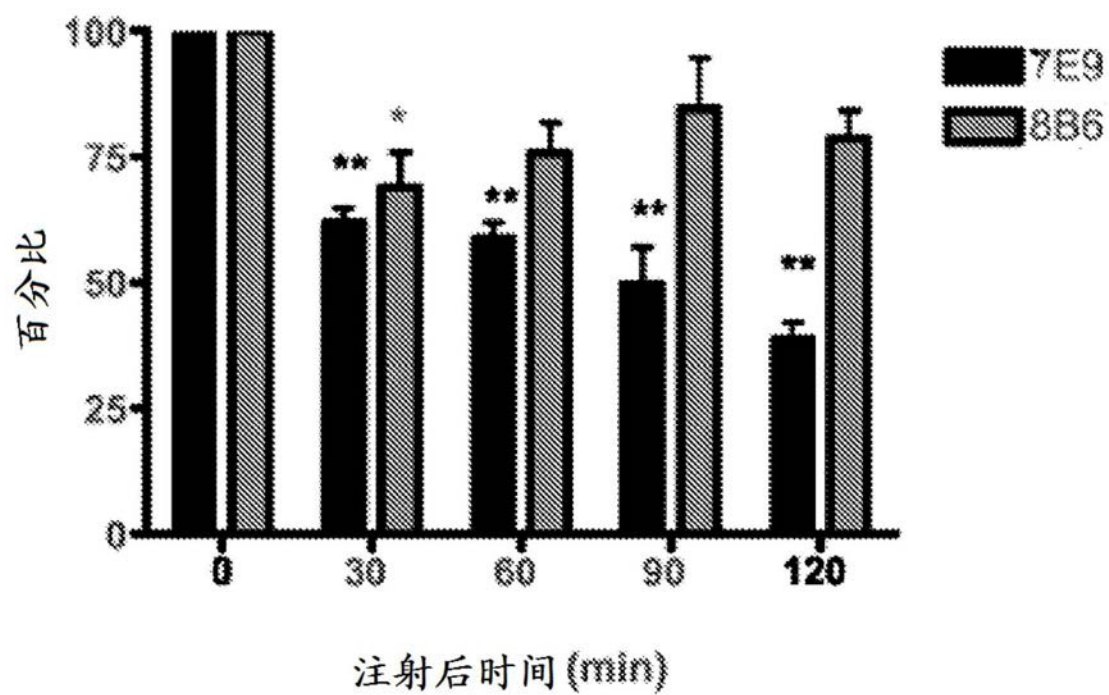


图4B

粗体=Kabat CDR
 加下划线=Chothia CDR

GI 重链

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100      110      120
      1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
      31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
      NYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASAT
      61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
      HYAEAVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRA
      91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
      EDTAVYYCLAYFDYGLAIONYWGQGTLVTV
      121 122
      SS
  
```

GI 轻链

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100      110      120
      1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
      EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRYT
      31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
      TYVSNYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGIPAA
      61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
      RFSGSGSGTDFTLTISSTLEPEDFAVYYCSQ
      91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
      L3
      SYNYPYTFGQGTKLEIK
  
```

图5

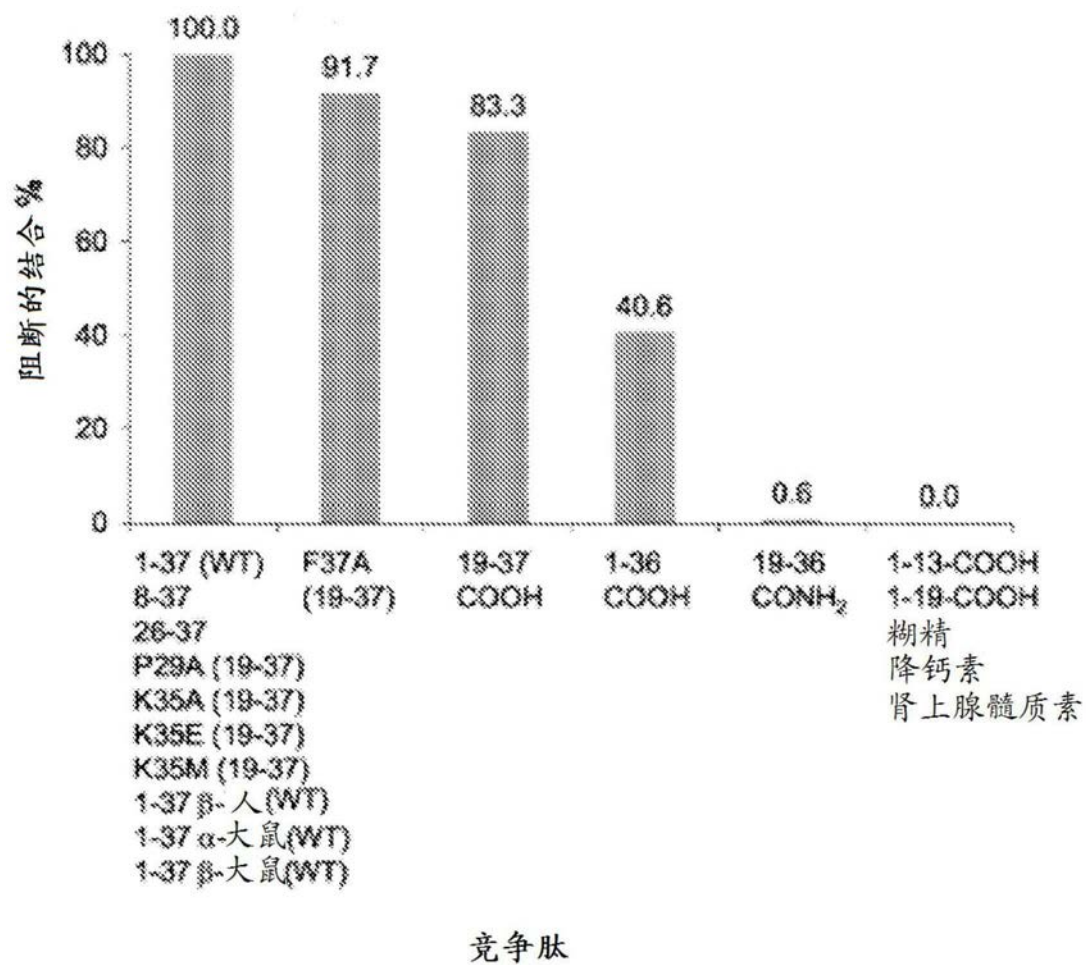


图6

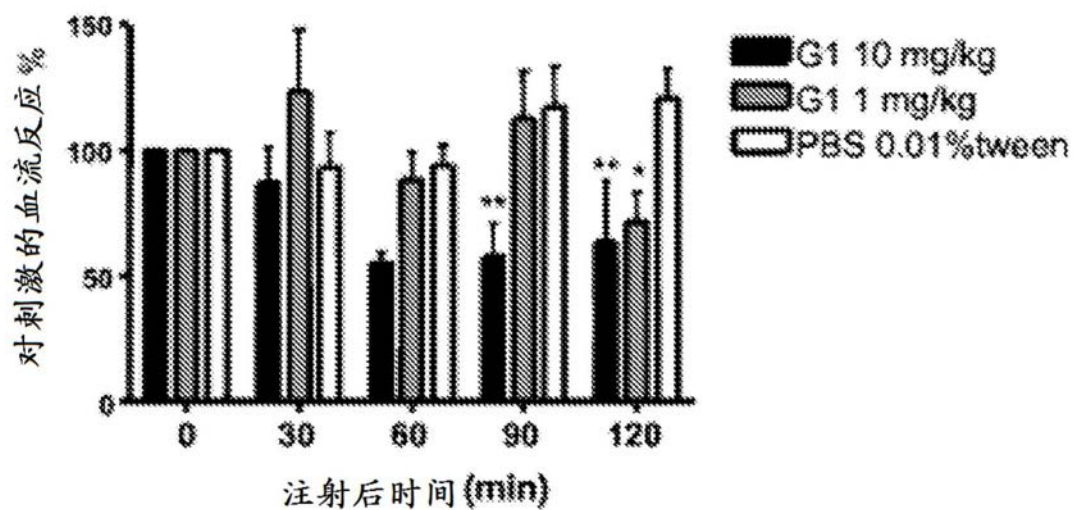


图7

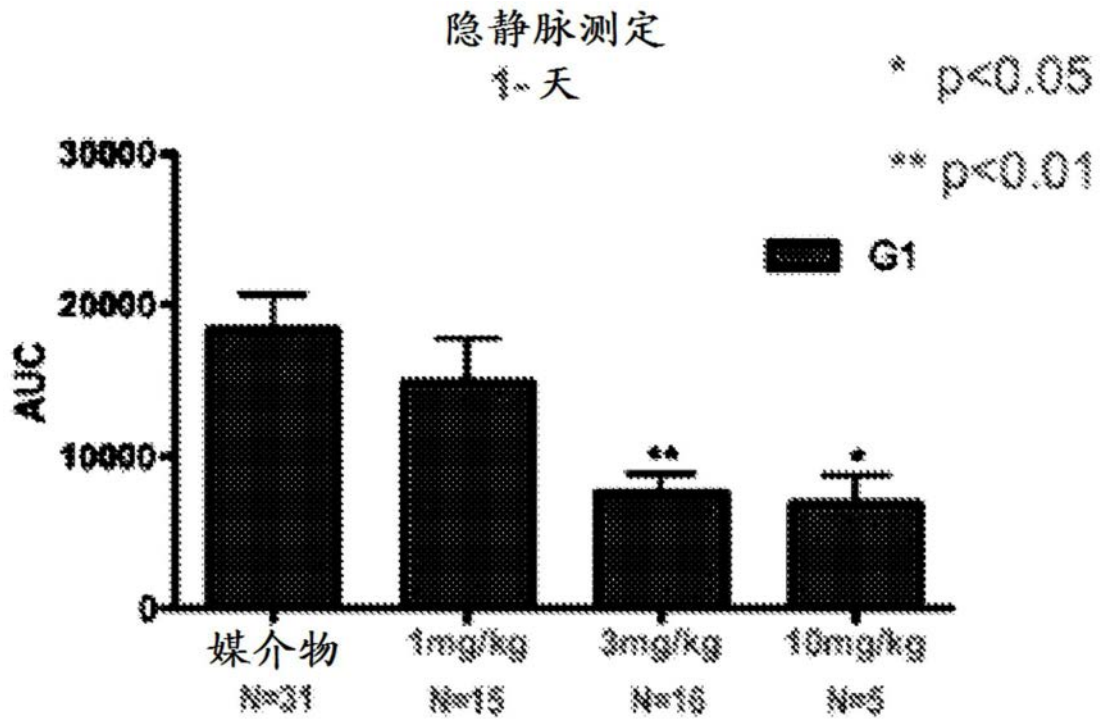


图8A

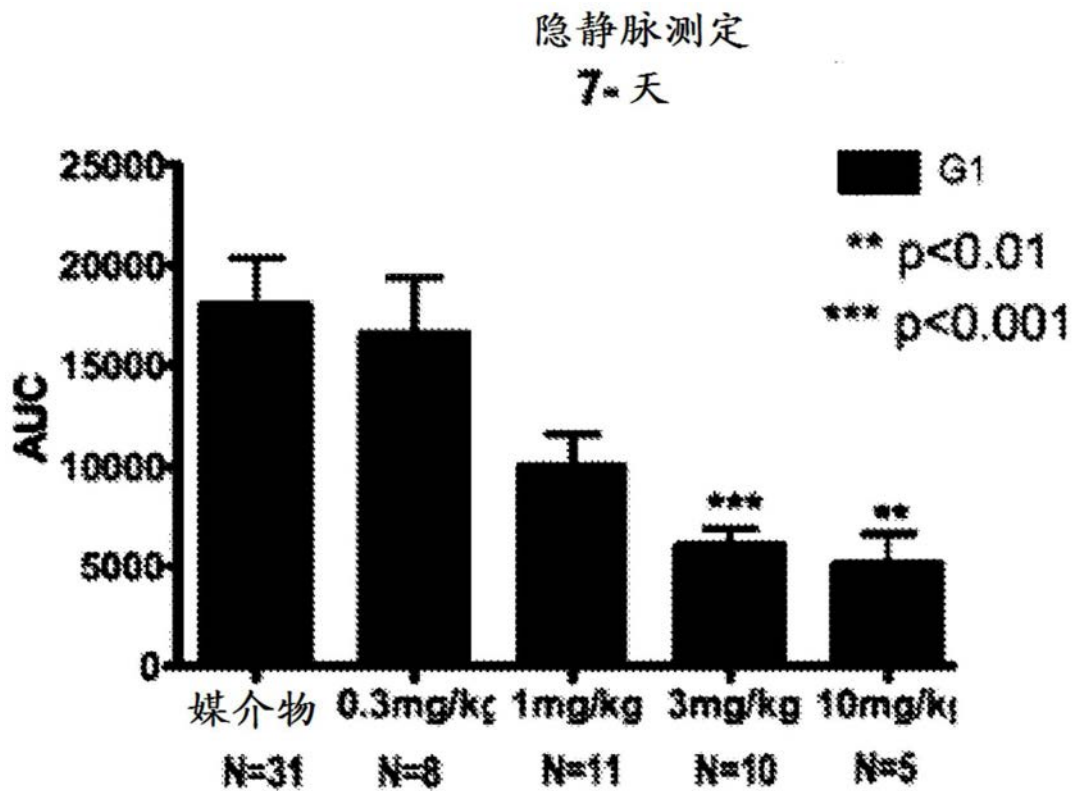


图8B

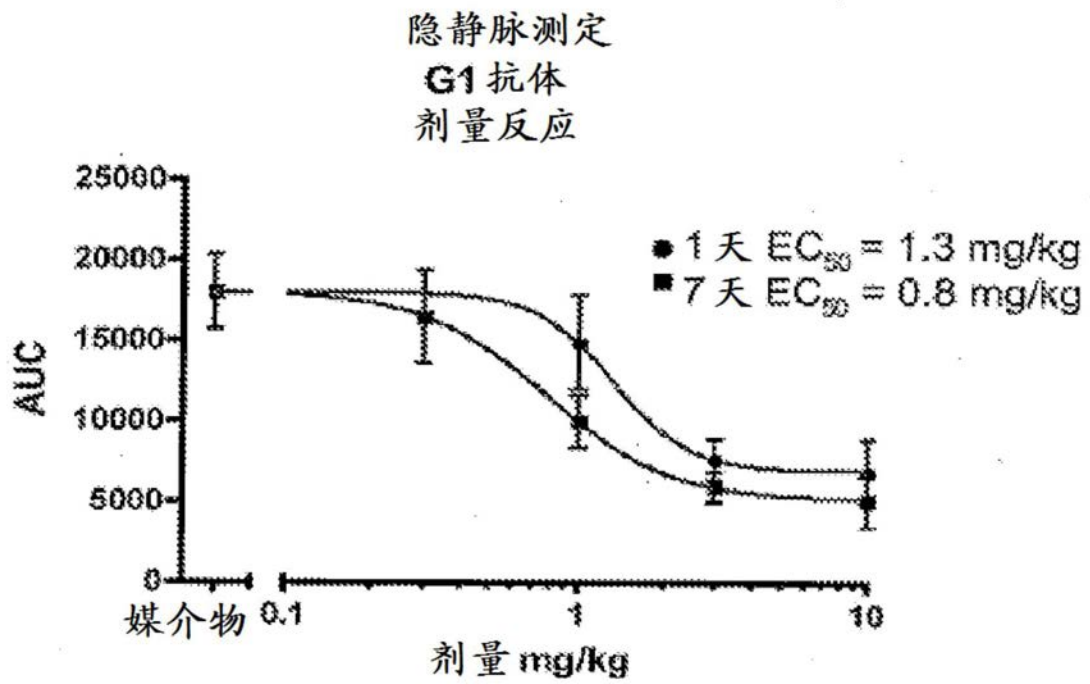


图8C

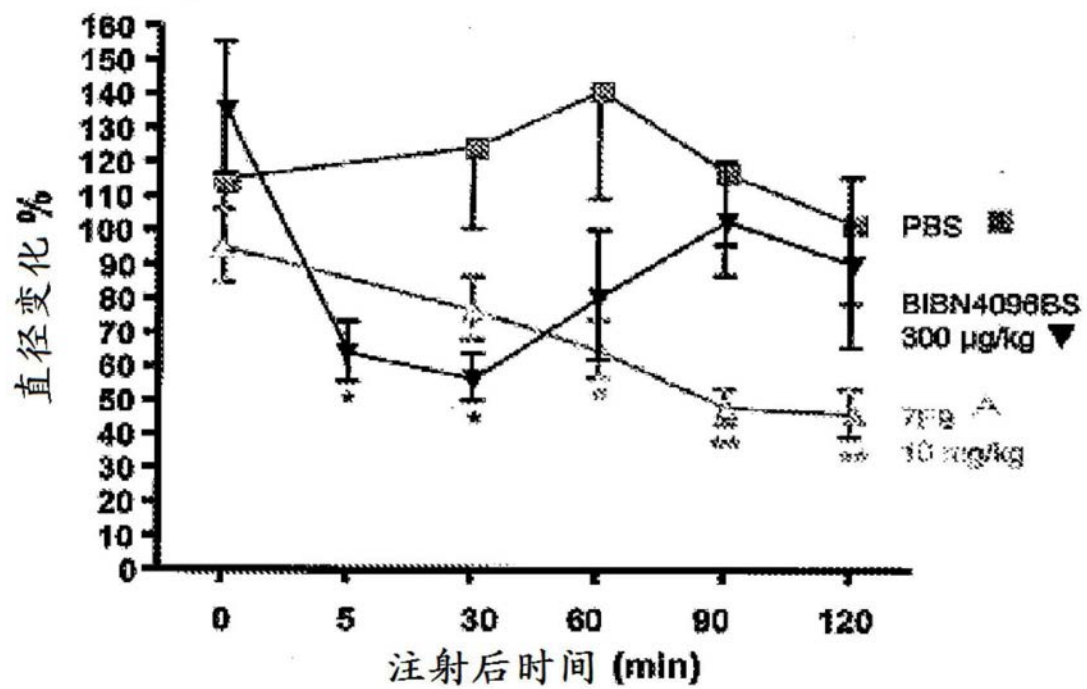


图9

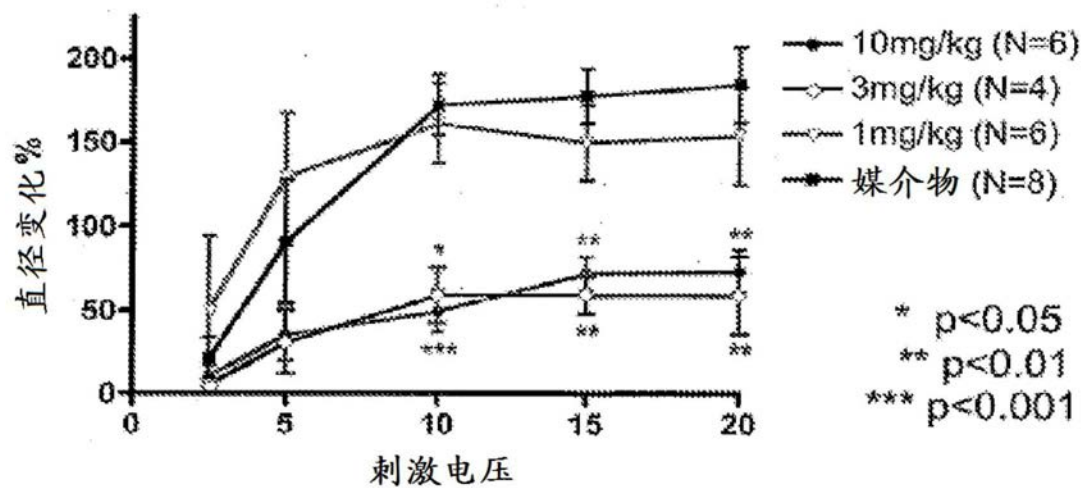


图10

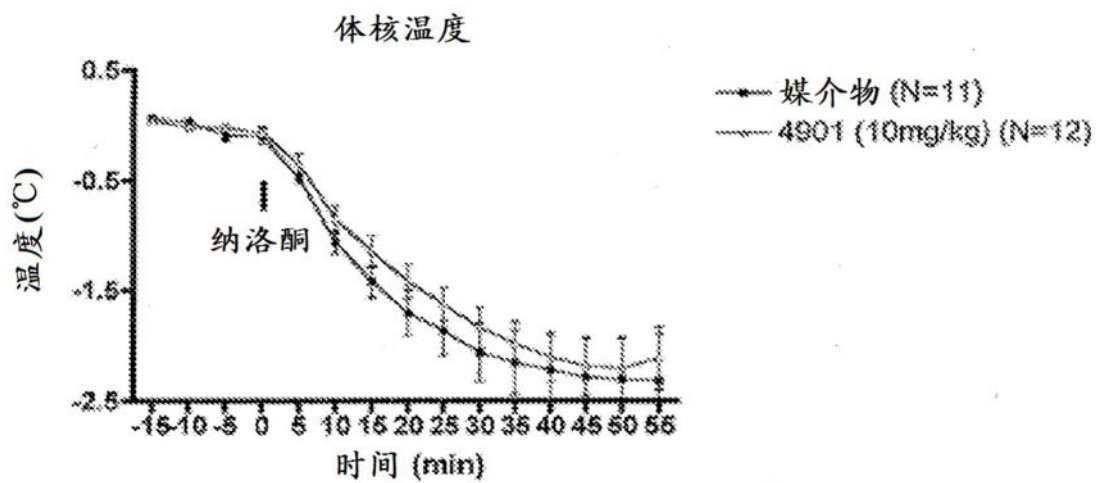


图11A

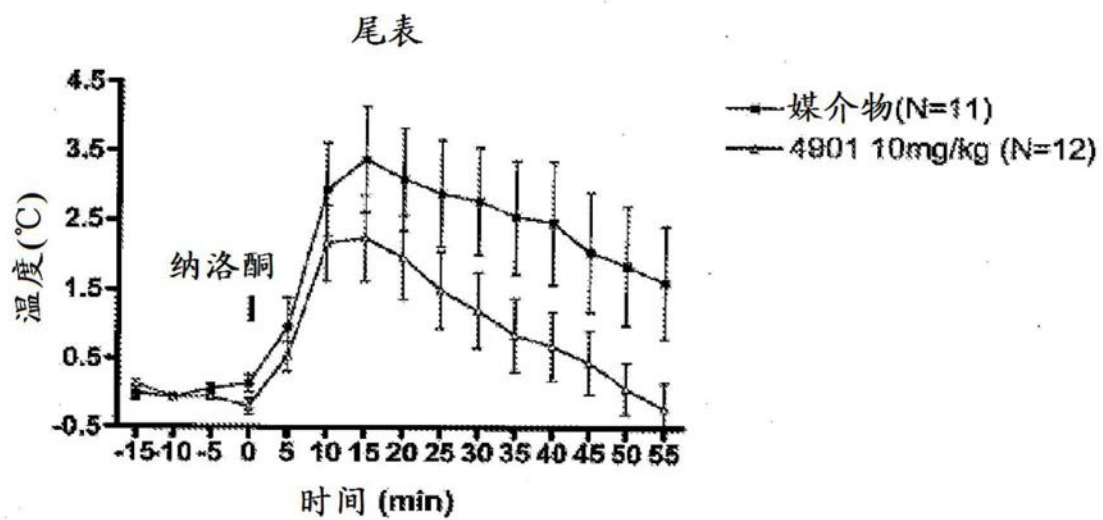


图11B

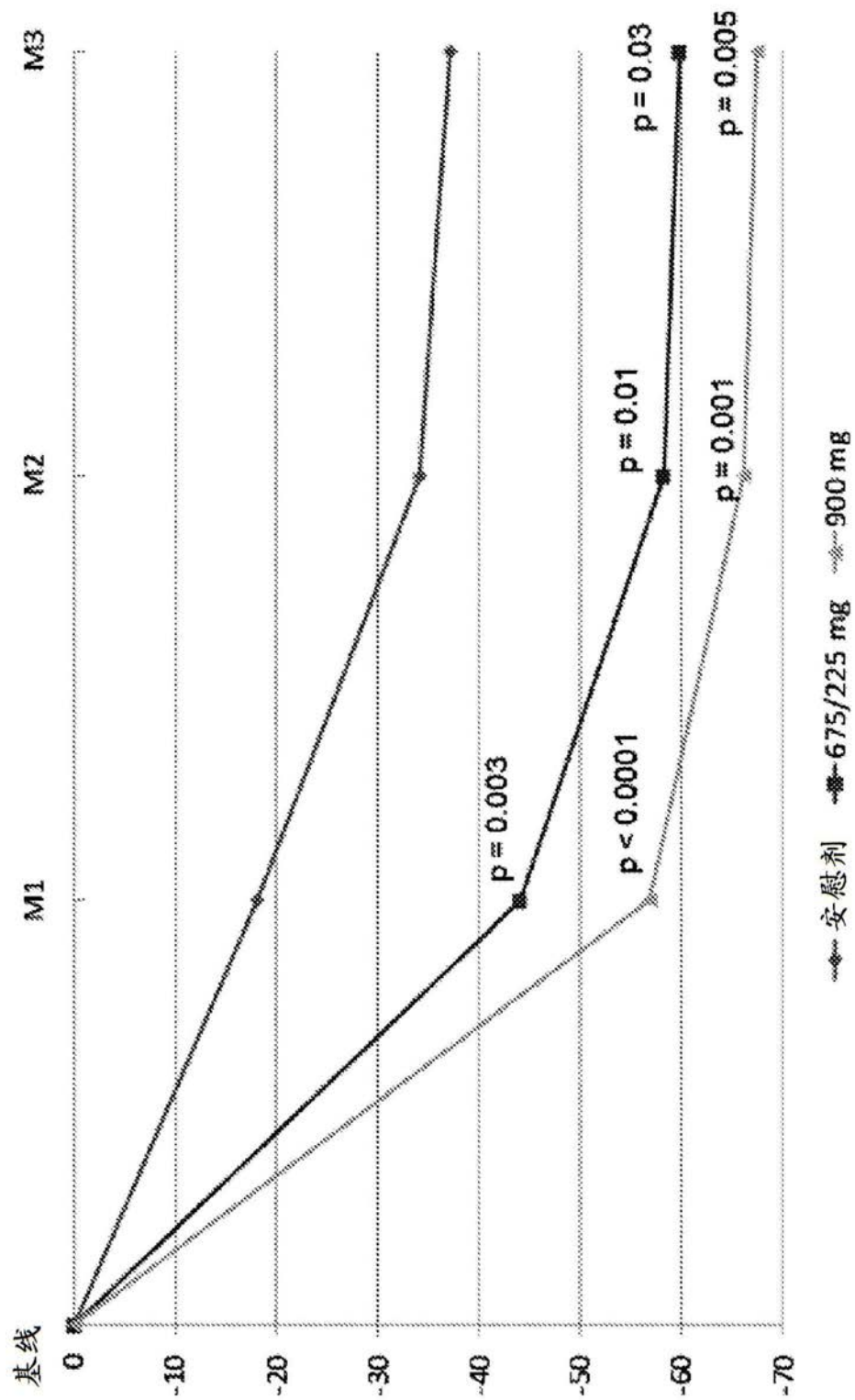


图12

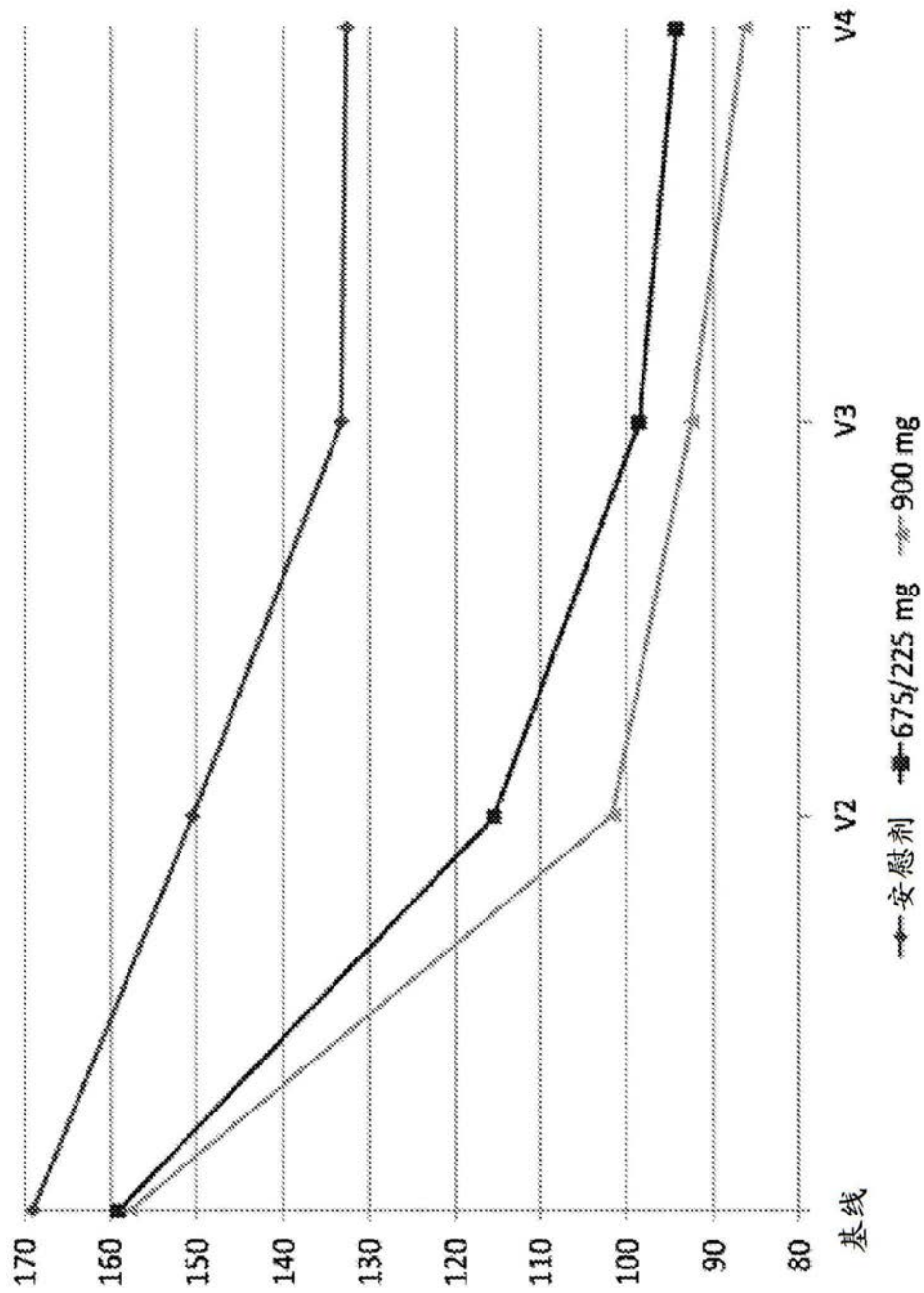


图13

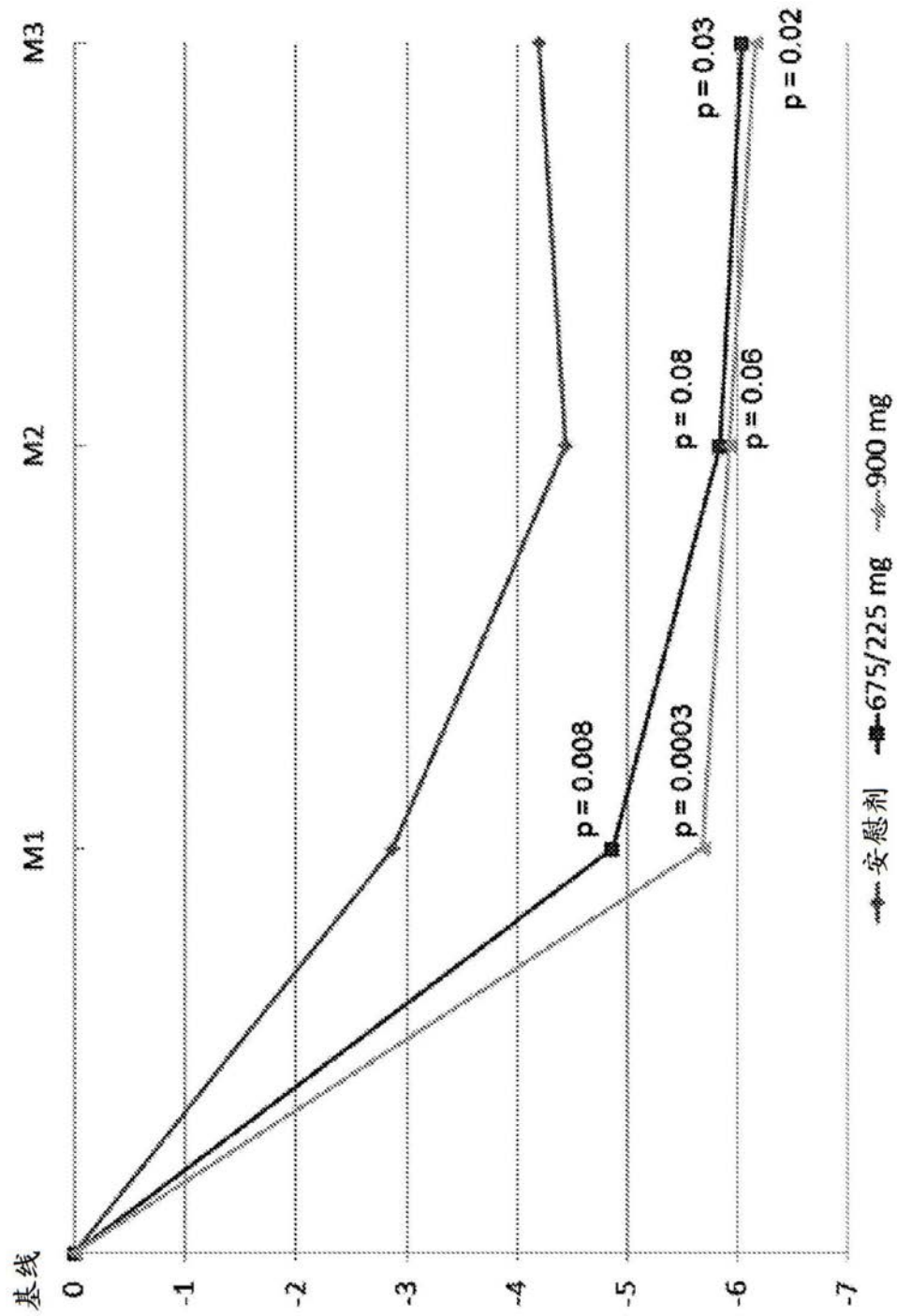


图14

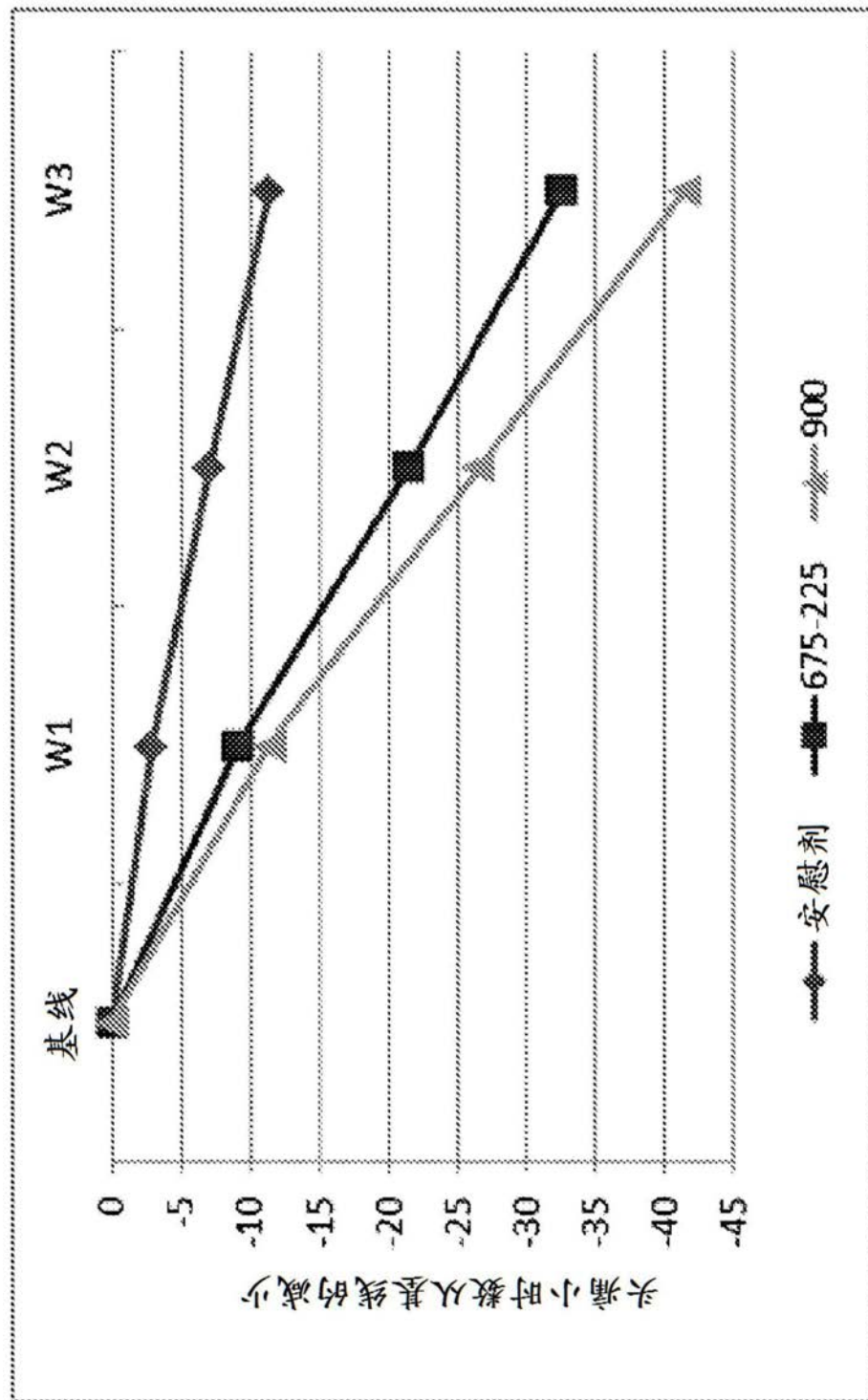


图15

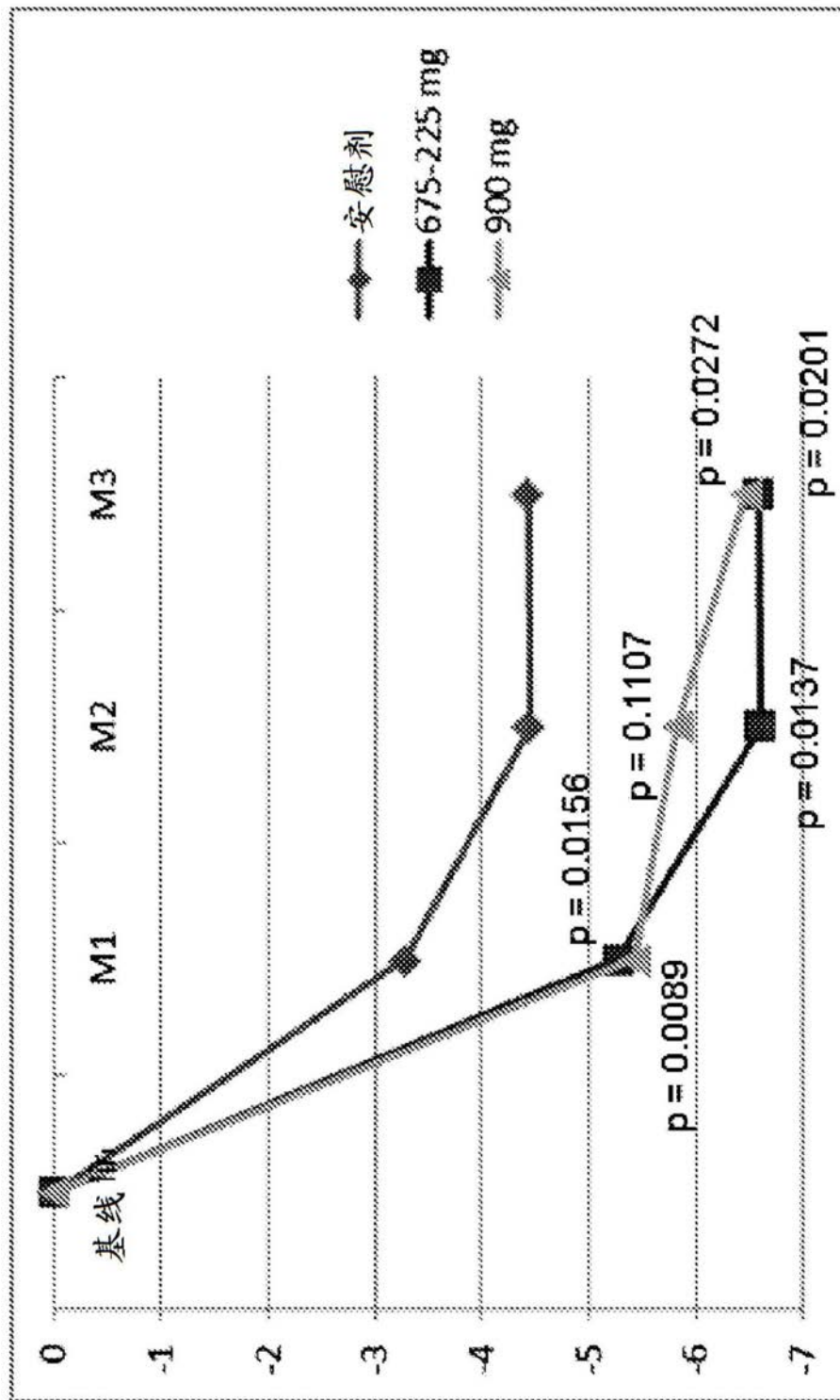


图16

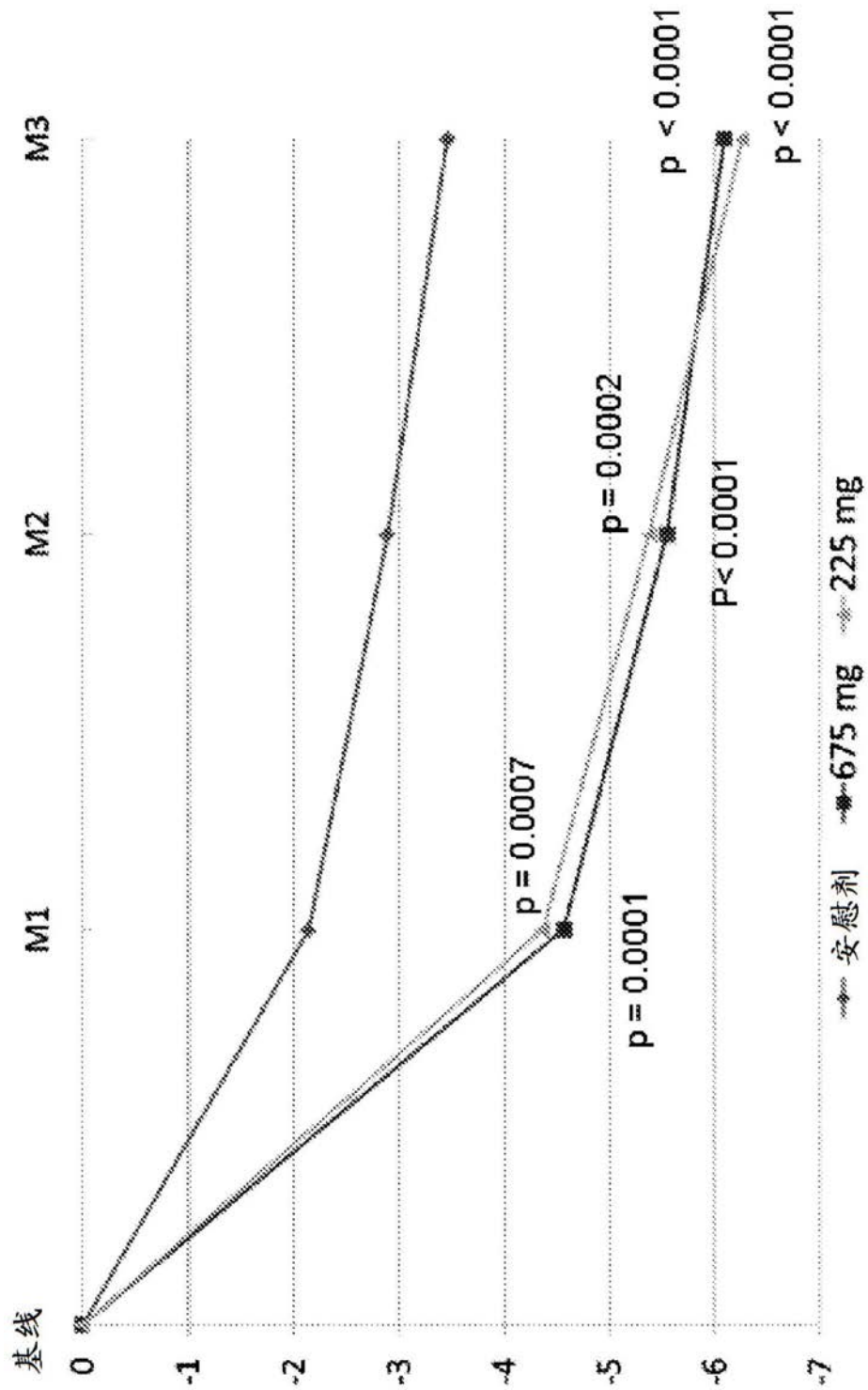


图17

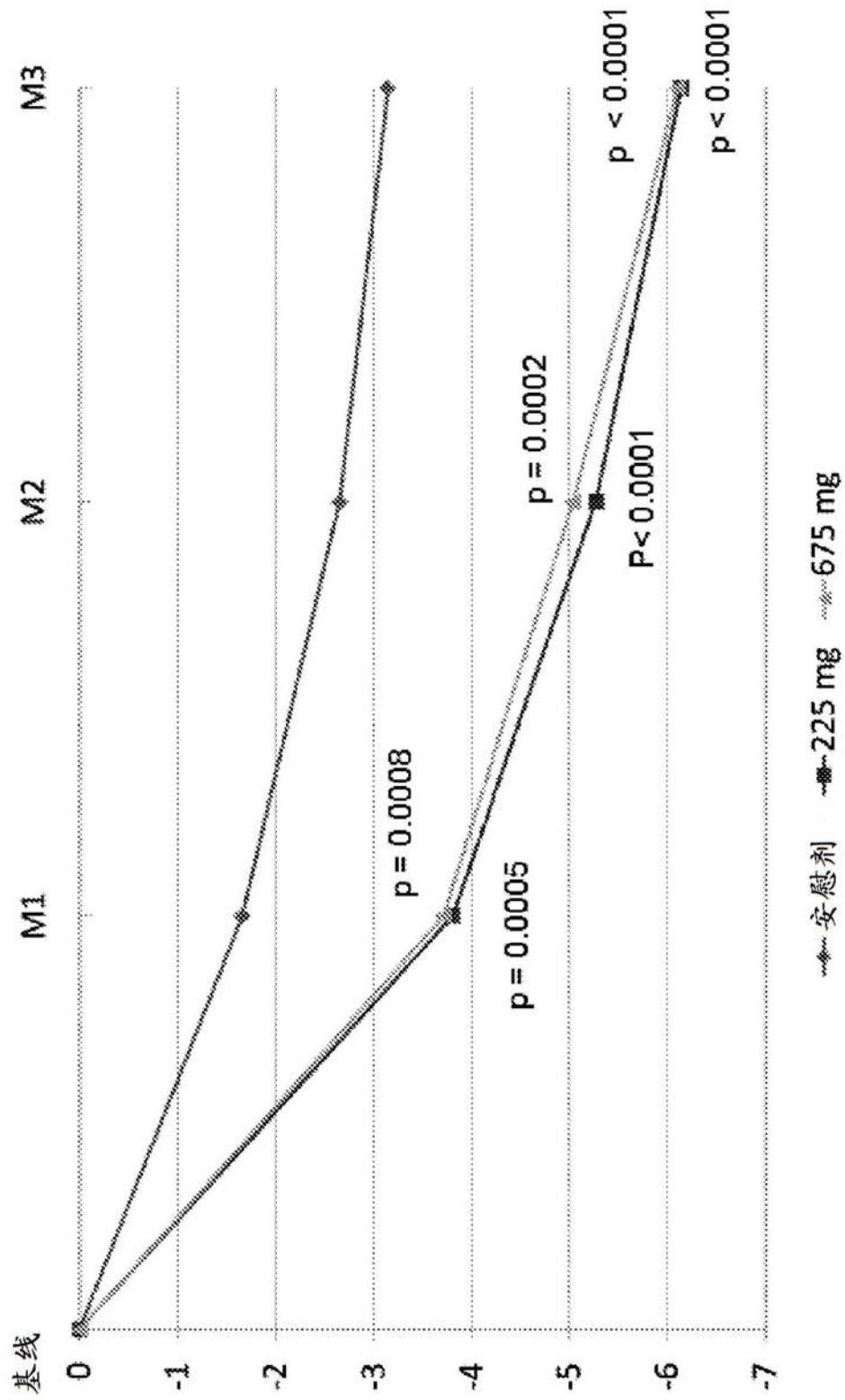


图18