



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 433 251**

⑮ Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2006 PCT/IB2006/003181**

⑰ Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2007 WO07054809**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2006 E 06809207 (1)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **24.07.2019 EP 1957106**

⑮ Título: **Anticuerpos antagonistas dirigidos contra un péptido relacionado con el gen de la calcitonina y procedimientos que utilizan los mismos**

⑩ Prioridad:

14.11.2005 US 736623 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
13.03.2020

⑬ Titular/es:

**TEVA PHARMACEUTICALS INTERNATIONAL GMBH (100.0%)
Schlüsselstrasse 12
8645 Jona, CH**

⑭ Inventor/es:

**ZELLER, JOERG;
POULSEN, KRISTIAN TODD;
ABDICHE, YASMINA NOUBIA;
PONS, JAUME;
COLLIER, SIERRA JONES y
ROSENTHAL, ARNON**

⑮ Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos antagonistas dirigidos contra un péptido relacionado con el gen de la calcitonina y procedimientos que utilizan los mismos.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de anticuerpos antagonistas anti-CGRP para la prevención, mejoría, o tratamiento de los síntomas vasomotores, tales como los dolores de cabeza (por ejemplo, migraña) y sofocos relacionados con el CGRP.

10

Antecedente de la invención

El CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) es un neuropéptido de 37 aminoácidos, que pertenece a una familia de péptidos que incluye la calcitonina, adrenomedulina y amilina. En los seres humanos, existen dos formas de CGRP (α -CGRP y β -CGRP) y tienen actividades similares. Varían en tres aminoácidos y muestran una distribución diferente. Hay al menos dos subtipos de receptores CGRP que también podrían indicar diferentes funciones. El CGRP es un neurotransmisor del sistema nervioso central, y se ha demostrado que es un potente vasodilatador en la periferia, donde las neuronas que contienen CGRP están estrechamente asociadas con los vasos sanguíneos. La vasodilatación mediada por el CGRP también se asocia con inflamación neurogénica, como parte de una cascada de acontecimientos que dan como resultado la extravasación de plasma y la vasodilatación del sistema microvascular y que está presente en la migraña.

El CGRP se ha destacado por su posible conexión con los síntomas vasomotores (Wyon y col. Scand. J. Urol. Nephrol. 35: 92-96 (2.001); Wyon y col. Menopause 7(1):25-30 (2.000)). Los síntomas vasomotores (VMS), tales como los sofocos y la sudoración nocturna, son los síntomas más comunes que se asocian con la menopausia, que se presentan en el 60% al 80% de todas las mujeres después de la menopausia natural o inducida quirúrgicamente. Los sofocos probablemente son una respuesta adaptativa del sistema nervioso central (CNS) al declive de los esteroides sexuales (Freedman Am. J. Human Biol. 13:453-464 (2.001)). Hasta la fecha, las terapias más eficaces para los sofocos son los tratamientos basados en hormonas, incluyendo los estrógenos y algunas progestinas. Los tratamientos hormonales pueden ser eficaces para aliviar los sofocos, pero no son apropiados para todas las mujeres. Los síntomas psicológicos y emocionales que se observan, tales como nerviosismo, fatiga, irritabilidad, insomnio, depresión, pérdida de memoria, dolores de cabeza, ansiedad, nerviosismo o incapacidad para concentrarse se consideran como la causa de la falta de sueño que sigue a los sofocos y la sudoración nocturna (Kramer y col., En: Murphy y col., 3.sup.rd Int'l Symposium on Recent Advances in Urological Cancer Diagnosis and Treatment-Proceedings, París, Francia: SCI: 3-7 (1.992)).

Los hombres también experimentan sofocos después de la retirada de las hormonas esteroides (andrógenos). Esto es cierto en casos de declive de andrógenos asociado a la edad (Katovich, y col., Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine, 1.990, 193(2): 129-35), así como en los casos extremos de supresión hormonal asociada con los tratamientos de cáncer de próstata (Berendsen, y col., European Journal of Pharmacology, 2.001, 419(1): 47-54). Hasta un tercio de estos pacientes experimentarán síntomas frecuentes y persistentes, suficientemente graves para causar molestias significativas e incomodidad.

El CGRP es un potente vasodilatador que se ha implicado en la patología de otros síntomas vasodilatadores, tales como todas las formas de dolor de cabeza vascular, incluyendo migrañas (con o sin aura) y cefalea en racimos. Durham, N. Engl. J. Med. 350:1073-1075, 2.004. Los niveles de CRGP en el suero en la vena yugular externa están elevados en pacientes durante la migraña. Goadsbyetal., Ann. Neurol. 28:183-7, 1.990. La administración intravenosa de α -CGRP humano induce dolor de cabeza y migraña en pacientes que padecen migrañas sin aura, sugiriendo que el CGRP tiene un papel causante en la migraña. Lassen y col., Cephalalgia 22:54-61, 2.002.

La posible implicación del CGRP en la migraña ha sido la base para el desarrollo y ensayo de varios compuestos que inhiben la liberación de CGRP (por ejemplo, sumatriptano), antagonizan el receptor del CGRP (por ejemplo, el dipéptido derivado BIBN409BS (Boehringer Ingelheim); CGRP (8 – 37)), o interactúen con una o más de las proteínas asociadas al receptor tales como, la proteína de membrana de actividad del receptor (RAMP) o la proteína componente del receptor (RCP), las cuales afectan la unión del CGRP a sus receptores. Brain, S. y col., Trends in Pharmacological Sciences 23: 51- 53, 2.002. Los subtipos de adrenoceptores alfa-2 y los receptores de la adenosina A1 también controlan (inhiben) la liberación de CGRP y la activación del trigémino (Goadsby y col., Brain 125:1392-401, 2.002). El agonista del receptor de adenosina A1 GR79236 (metafradil), que se ha demostrado que inhibe la vasodilatación neurogénica y la nocicepción del trigémino en seres humanos, también pueden tener una actividad anti-migrañas (Arulmani y col., Cephalalgia 25: 1082-1090, 2.005; Giffin y col., Cephalalgia 23: 287- 292, 2.003).

Lo desconcertante en esta teoría es la observación de que el tratamiento con compuestos que inhiben exclusivamente la inflamación neurogénica (por ejemplo, antagonistas del receptor NK1 de la taquicinina) o la activación trigémina (por ejemplo, los agonistas del receptor 5HT_{1D}) han demostrado ser relativamente ineficaces en los tratamientos agudos de migraña, llevando a algunos investigadores a cuestionarse si la inhibición de la liberación

de CGRP es el mecanismo de acción de primera elección en los tratamientos eficaces anti-migraña. Arulmani y col., Eur. J. Pharmacol. 500:315-330, 2.004.

- 5 La migraña es una afección neurológica compleja común que se caracteriza por ataques episódicos graves de dolor de cabeza y características asociadas, que pueden incluir náuseas, vómitos, sensibilidad a la luz, el ruido o movimiento. En algunos pacientes, el dolor de cabeza está precedido o acompañado por un aura. El dolor de cabeza puede ser intenso y también puede ser unilateral en ciertos pacientes.
- 10 Los ataques de migraña perturban la rutina diaria. En EE.UU. y Europa occidental, la prevalencia total de personas que sufren migrañas es del 11% de la población general (el 6% masculina; el 15-18% femenina). Además, la frecuencia media de los ataques en un individuo es de 1,5/mes. Aunque hay varios tratamientos disponibles para aliviar o reducir los síntomas, se recomienda la terapia preventiva para aquellos pacientes que tienen más de 3-4 ataques de migraña al mes. Goadsby y col. New Engl. J. Med. 346(4): 257-275, 2.002.
- 15 La variedad de intervenciones farmacológicas que han venido utilizándose para tratar la migraña y la variabilidad en la respuesta entre los pacientes son el testimonio de la naturaleza diversa de este trastorno. Por tanto, se han utilizado drogas relativamente no selectivas tales como los alcaloides del cornezuelo (por ejemplo, ergotamina, dihidroergotamina, metisergida), que muestran actividad serotoninérgica, así como adrenérgica, noradrenérgica y dopaminérgica, durante más de ochenta años para tratar la migraña. Otros tratamientos incluyen opiáceos (por ejemplo, oxicodona) y antagonistas β -adrenérgicos (por ejemplo, propanolol). Algunos pacientes, habitualmente los que tienen síntomas más suaves, son capaces de controlar sus síntomas con remedios que no necesitan prescripción tales como uno o más agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como una combinación de aspirina, paracetamol y cafeína (por ejemplo, Excedrin® Migraña).
- 20
- 25 Más recientemente, algunos pacientes de migraña se han tratado con topiramato, un anticonvulsivante que bloquea los canales de sodio dependientes del voltaje y ciertos receptores de glutamato (AMPA-kainato), potencia la actividad del receptor GABA-A y bloquea la anhidrasa carbónica. El éxito relativamente reciente de los receptores agonistas de la serotonina 5HT-1B/1D y/o 5HT-1a, tal como sumatriptano, en algunos pacientes ha llevado a los investigadores a proponer una etiología serotoninérgica del trastorno. Desafortunadamente, aunque algunos pacientes responden bien a este tratamiento, otros son relativamente resistentes a sus efectos.
- 30

Se ha postulado que el trastorno tiene su origen en una disfunción de un canal iónico en los núcleos aminérgicos del tronco encefálico, sin embargo, la patofisiología precisa de la migraña, aún no se comprende bien. Se ha demostrado que una forma de migraña, la migraña hemipléjica familiar, se asocia con mutaciones contrasentido en la subunidad $\alpha 1$ del canal del calcio tipo P/Q con apertura por voltaje, y se piensa que probablemente se encontrarán también otras mutaciones de canales iónicos en otras poblaciones de pacientes. Aunque la dilatación de los vasos sanguíneos se asocia con y exacerbar los síntomas dolorosos de la migraña, estos eventos neuromusculares se piensa ahora que son el resultado, más que la causa, de la afección. En general, la disfunción de las rutas del tronco encefálico que modulan el estímulo sensorial se considera que es una característica unificante de la migraña. Goadsby, P.J. y col., New Engl. J. Med. 346(4): 257-275, 2.002.

Breve sumario de la invención

- 45 La invención que se desvela en el presente documento concierne a anticuerpos antagonistas anti-CGRP para su uso en un procedimiento que trata o previene los dolores de cabeza, tal como la migraña con o sin aura, la migraña hemipléjica, los dolores de cabeza en racimo, la neuralgia migrañosa, los dolores de cabeza crónicos, los dolores de cabeza por tensión, y los dolores de cabeza que resultan de otras afecciones médicas (tales como infección o aumento de la presión en el cráneo debido a un tumor).
- 50 Según la presente invención, se proporciona un anticuerpo antagonista anti-CGRP que es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado con una afinidad de unión (K_D) al α -CGRP humano de 50 nM o menos cuando se mide por resonancia de plasmones de superficie a 37 °C, para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir el dolor de cabeza (por ejemplo, migraña y dolor de cabeza en racimo) en un individuo que comprende la administración al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo antagonista anti-CGRP de la invención.
- 55
- 60 En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une a ambos α -CGRP y β -CGRP humanos. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une a CGRP humano y de rata. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al epítopo del extremo C en los aminoácidos 25-37 del CGRP.
- 65 En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones el anticuerpo antagonista anti-CGRP está humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP es un anticuerpo G1 (como se describe en el presente documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende una o más CDR (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o en algunas realizaciones todas, las seis CDR) del anticuerpo G1 o variantes del G1 que se muestran en la Tabla 6. En otras realizaciones más, el anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende

la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en la Figura 5 (SEC. ID Nº: 1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se muestra en la Figura 5 (SEC. ID Nº: 2).

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte (incluyendo inmunológicamente inerte parcial), por ejemplo, que no inicia la destrucción mediada por complemento, no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), no activa la microglía, o que tiene reducidas una o más de estas actividades. En algunas realizaciones, la 10 región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1.999) 29:2613-2624; Solicitud de Patente Nº PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de Patente del R.U Nº 9809951.8. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una 15 región constante de cadena pesada en IgG2 humana que comprende las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2 del tipo silvestre) Eur. J. Immunol. (1.999) 29:2613-2624. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada del anticuerpo es una cadena pesada de IgG1 humana con cualquiera de las siguientes mutaciones: 1) A327A330P331 a G327S330S331; 2) E233L234L235G236 a P233V234A235 con G236 borrado; 3) E233L234L235 a P233V234A235; 4) E233L234L235G236A327A330P331 a P233V234A235G327S330S331; y 6) N297 a A297 o cualquier otro aminoácido 20 excepto N. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada del anticuerpo es una cadena pesada de IgG4 humana con cualquiera de las siguientes mutaciones: E233F234L235G236 a P233V234A235 con G236 borrado; E233F234L235 a P233V234A235; y S228L235 a P228E235.
- 25 En otras realizaciones más, la región constante está aglicosilada por glicosilación unida a N. En algunas realizaciones, la región constante está aglicosilada por glicosilación unida a N por mutación del resto de fijación del oligosacárido (tal como Asn297) y/o los restos laterales que son parte de la secuencia de reconocimiento de la glicosilación N en la región constante. En algunas realizaciones, la región constante está aglicosilada por 30 glicosilación unida a N. La región constante puede estar aglicosilada por glicosilación unida a N enzimática o por expresión de la glicosilación en una célula hospedadora deficiente.
- 35 La afinidad de unión (K_D) de un anticuerpo antagonista anti-CGRP al α -CGRP humano medida por resonancia de plasmiones de superficie a 37 °C es 50 nM o menos.
- 40 El anticuerpo antagonista anti-CGRP se puede administrar antes, durante y/o después del dolor de cabeza. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se administra antes del ataque de dolor de cabeza (por ejemplo, migraña o dolor de cabeza en racimo). La administración de un anticuerpo antagonista anti-CGRP puede 45 hacerse por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo: la vía oral, intravenosa, subcutánea, intraarterial, intramuscular, intracardíaca, intraespinal, intratorácica, intraperitoneal, intraventricular, sublingual, transdérmica, y/o vía inhalatoria. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, por vía intravenosa, o localizada.
- 50 En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se puede administrar en conjunción con otro agente, tal como otro agente para tratar el dolor de cabeza.
- 55 La presente invención puede usar anticuerpos antagonistas anti-CGRP y polipéptidos derivados del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6. En consecuencia, en un aspecto, la invención es un anticuerpo G1 (llamado de forma intercambiable "G1") que lo producen los vectores de expresión que tienen los números de referencia de ATCC PTA-6866 y PTA-6867. Por ejemplo, en una realización es un anticuerpo que comprende una 60 cadena pesada producida por el vector de expresión con nº de referencia de ATCC PTA-6867. En una realización más es un anticuerpo que comprende una cadena ligera producida por el vector de expresión con nº de referencia de ATCC PTA-6866. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del G1 se muestran en la Figura 5. Las partes de la región complementariamente determinante (CDR) del anticuerpo G1 (incluyendo las CDR Chothia y Kabat) también se muestran en la Figura 5. Se entiende que la referencia a cualquier parte de o la región entera del G1 engloba secuencias producidas por los vectores de expresión que tienen N° de referencia de ATCC PTA-6866 y PTA-6867, y/o las secuencias representadas en la Figura 5. La invención 65 puede usar variantes del anticuerpo G1 con las secuencias de aminoácidos representados en la Tabla 6.
- 70 En otro aspecto, la invención usa un anticuerpo que comprende un dominio V_H que al menos el 85%, al menos el 86%, al menos el 88%, al menos el 89%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% es idéntico en la secuencia de aminoácidos a la SEC. ID Nº: 1.
- 75 En otro aspecto, la invención usa un anticuerpo que comprende un dominio V_L que al menos el 85%, al menos el 86%, al menos el 87%, al menos el 88%, al menos el 89%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% es idéntico en la secuencia de aminoácidos a la SEC. ID Nº: 2.
- 80 En otro aspecto, la invención usa un anticuerpo que comprende un fragmento o una región del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6. En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo G1. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo G1. En otra realización más, el fragmento

contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo G1. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada que se muestran en la Figura 5. En otra realización más, el fragmento contiene una o más CDR de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo G1.

- 5 En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (los cuales pueden ser o no anticuerpos) que comprenden una CDR3 V_H como se expone en la SEC. ID N°: 5, o una secuencia que se diferencia de la SEC. ID N°: 5 por la sustitución de 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos. En una realización en particular, tales sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservadoras.
- 10 En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (los cuales pueden ser o no anticuerpos) que comprenden una CDR3 V_L como se expone en la SEC. ID N°: 8, o una secuencia que se diferencia de la SEC. ID N°: 8 por la sustitución de 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos. En una realización particular, tales sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservadoras.
- 15 En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (los cuales pueden ser o no anticuerpos) que comprenden cualquiera o más de lo siguiente: a) una o más CDR del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; b) CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; c) CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; d) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; e) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; f) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6. La invención proporciona además polipéptidos (los cuales pueden ser o no anticuerpos) que comprenden cualquiera o más de lo siguiente: a) una o más (una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) CDR que se derivan del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; b) una CDR derivada CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo G1 y/o c) una CDR derivada de la CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo G1. En algunas realizaciones, la CDR es una CDR que se muestra en la Figura 5. En algunas realizaciones, la una o más CDR derivada del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6 son al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 86%, al menos aproximadamente el 87%, al menos aproximadamente el 88%, al menos aproximadamente el 89%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98% o al menos aproximadamente el 99% idénticas a al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis CDR del G1 o sus variantes.
- 35 En algunas realizaciones, la CDR es una CDR Kabat. En otras realizaciones, la CDR es una CDR Chothia. En otras realizaciones, la CDR es una combinación de una CDR Kabat y Chothia (también denominada "CDR combinada" o "CDR extendida"). En otras palabras, para cada realización determinada que contiene más de una CDR, la CDR puede ser cualquiera, Kabat, Chothia, y/o combinadas.
- 40 En algunas realizaciones, el polipéptido (tal como un anticuerpo) comprende la secuencia de aminoácidos KASKX-aaVXaaTYVS, en la que Xaa en la posición 5 es R, W, G, L, o N; en el que Xaa en la posición 7 es T, A, D, G, R, S, W, o V. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos KASKXaaVXaaTYVS es la CDR de una cadena ligera del anticuerpo.
- 45 En algunas realizaciones, el polipéptido (tal como un anticuerpo) comprende la secuencia de aminoácidos XaaX-aaSNRYXaa, en la que Xaa en la posición 1 es G o A; en la que Xaa en la posición 2 es A o H; y en la que Xaa en la posición 7 es L, T, I, o S. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos XaaXaaSNRYXaa es una CDR de una cadena ligera del anticuerpo.
- 50 En algunas realizaciones, el polipéptido (tal como un anticuerpo) comprende la secuencia de aminoácidos EIRSX-aaSDXaaXaaATXaaYAXaaAVKG, donde Xaa en la posición 5 es E, R, K, Q, o N; en la que Xaa en la posición 8 es A, G, N, E, H, S, L, R, C, F, Y, V, D, o P; en la que Xaa en la posición 9 es S, G, T, Y, C, E, L, A, P, I, N, R, V, D, o M; en la que Xaa la posición 23 es H o F; en la que Xaa en la posición 15 es E o D. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos EIRSXaaSDXaaXaaATXaaYAXaaAVKG es una CRD2 de una cadena pesada del anticuerpo.
- 55 En algunas realizaciones, el polipéptido (tal como un anticuerpo) comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID N°:1, en la que el resto aminoacídico en la posición 99 de la SEC. ID N°:1 es L o está sustituido por A, N, S, T, V, o R; y en la que los restos aminoacídicos en la posición 100 de la SEC. ID N°:1 es A o está sustituido por L, R, S, V, Y, C, G, T, K, o P.
- 60 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo (o polipéptido) está aislado. En algunas realizaciones, el anticuerpo (o polipéptido) es sustancialmente puro.

La región constante de la cadena pesada de los anticuerpos puede ser de cualquiera de los tipos de región constante, tales como IgG, IgM, IgD, IgA, e IgE; y cualquier isotipo, tal como IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4.

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada como se describe en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La figura 1 es una tabla que muestra las afinidades de unión de 12 anticuerpos murinos para diferentes fragmentos de α -CGRP humano con sustitución de alanina. Las afinidades de unión se midieron a 25 °C utilizando el Biacore fluyendo Fabs a través de los CGRP sobre el chip. Los valores encasillados representan la pérdida de afinidad de los mutantes de alanina en relación al fragmento parental, 25-37 (en cursiva), excepto K35A, que se derivó a partir de un 19-37 parental. “^a” indica afinidades para los fragmentos 19-37 y 25-37 son el promedio medio \pm desviación estándar de dos mediciones independientes sobre los diferentes chips sensores. “^b” indica estas interacciones desviadas de un modelo de interacción bimolecular simple debido a una constante de disociación bifásica, por lo que sus afinidades se determinaron utilizando un modelo de cambio conformacional. Clave de escala de grises: blanco (1,0) indica la afinidad parental; gris claro (menos de 0,5) indica una afinidad mayor que la parental; gris oscuro (más de 2) indica menor afinidad que la parental; y el negro indica que no se detectó ninguna unión.
- 15 Las figuras 2A y 2B muestran el efecto de la administración de CGRP 8-37 (400 nmol/kg), anticuerpo 4901 (25 mg/kg), y anticuerpo 7D11 (25 mg/kg) sobre el flujo sanguíneo de la piel medido como flujo celular sanguíneo después de la estimulación por pulsos eléctricos durante 30 segundos. El CGRP 8-37 se administró intravenosamente (iv) 3-5 min antes de la estimulación por pulsos eléctricos. Los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal (ip) 72 horas antes de la estimulación por pulsos eléctricos. Cada punto en los gráficos representa el AUC de una rata tratada bajo las condiciones indicadas. El AUC (área bajo la curva) igual el flujo A x tiempo A. “Flujo A” representa el cambio de unidades de flujo después de la estimulación por pulsos eléctricos; y “tiempo A” representa el periodo de tiempo que toma el flujo celular para volver al nivel de antes de la estimulación por pulsos eléctricos.
- 20 Las figuras 3 muestra el efecto de la administración de distintas dosificaciones de anticuerpo 4901 (25 mg/kg, 5 mg/kg, 2,5 mg/kg, o 1 mg/kg) sobre el flujo sanguíneo cutáneo como el flujo celular sanguíneo después de una estimulación por pulsos eléctricos durante 30 segundos. Los anticuerpos se administraron por vía intravenosa (iv) 24 horas antes de la estimulación por pulsos eléctricos. Cada punto en el gráfico representa el AUC de una rata tratada bajo las condiciones indicadas. La línea del gráfico representa el promedio de AUC de ratas tratadas bajo las condiciones indicadas.
- 25 Las figuras 4A y 4B muestran el efecto de la administración del anticuerpo 4901 (1 mg/kg o 10 mg/kg, i.v.), el anticuerpo 7E9 (10 mg/kg, i.v.), y el anticuerpo 8B6 (10 mg/kg, i.v.) sobre el flujo sanguíneo de la piel medido como el flujo celular sanguíneo después de una estimulación por puso eléctrico durante 30 segundos. Los anticuerpos se administraron por vía intravenosa (i.v.) seguido por estimulación por pulsos eléctricos a los 30 min, 60 min, 90 min, y 120 min después de la administración del anticuerpo. El eje Y representa el porcentaje de AUC cuando se compara con el nivel de AUC cuando no se administra ningún anticuerpo (tiempo 0). El eje X representa el periodo de tiempo (minutos) entre la administración de anticuerpos y la estimulación por pulsos eléctricos. “^a” indica una $p<0,05$, y “^{**}” indica una $p<0,01$, cuando se compara con el tiempo 0. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una dirección con un ensayo de comparación múltiple de Dunnett.
- 30 Las figuras 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (SEC. ID N°:1) y la región variable de la cadena ligera (SEC. ID N°:2) del anticuerpo G1. Las CDR Kabat están en el texto en negrita, y las CDR Chothia están subrayadas. Los restos de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera se han numerado secuencialmente.
- 35 La figura 6 muestra lo localización de epítopos del anticuerpo G1 por competición de péptidos utilizando Biacore. El α -CGRP se capturó en el chip sensor SA. El Fab del G1 (50 nM) en ausencia de un péptido competidor o pre-incubado durante una hora con 10 uM de un péptido competidor se derramó sobre el chip. Se midió la unión del Fab G1 al α -CGRP en el chip. El eje Y representa el promedio de unión bloqueado por la presencia del péptido competidor comparado con la unión en ausencia del péptido competidor.
- 40 La figura 7 muestra el efecto de la administración del anticuerpo G1 (1 mg/kg o 10 mg/kg, i.v.) o el vehículo (PBS, Tween al 0,01%) sobre el flujo sanguíneo de la piel como el flujo celular sanguíneo después de una estimulación por pulsos eléctricos durante 30 segundos. El anticuerpo G1 o el vehículo se administró por vía intravenosa (i.v.) seguido por estimulación nerviosa por pulsos eléctricos a los 30 min, 60 min, 90 min, y 120 min después de la administración del anticuerpo. El eje Y representa el porcentaje de AUC cuando se compara con el nivel del AUC cuando no se administró (tiempo 0) ni anticuerpo ni vehículo (definido como el 100%). El eje X representa el periodo de tiempo (en minutos) entre la administración de los anticuerpos y la estimulación por pulsos eléctricos. “^a” indica una $p<0,05$, y “^{**}” indica una $p<0,01$, cuando se compara con el vehículo. Los datos se analizaron utilizando el ANOVA de dos direcciones y los post-ensayos de Bonferroni.
- 45 La figura 8A muestra el efecto de la administración del anticuerpo G1 (1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg, i.v.) o el vehículo (PBS, Tween 20 al 0,01%) sobre el flujo sanguíneo de la piel medido como el flujo celular sanguíneo después de la estimulación por pulsos eléctricos durante 30 segundos, 24 horas después de la dosificación. El anticuerpo G1 o el vehículo se administró por vía intravenosa (i.v.) 24 horas antes de la estimulación nerviosa por

5 pulsos eléctricos. El eje Y representa el área bajo la curva total (cambio en el flujo celular sanguíneo multiplicado por el cambio en el tiempo desde la estimulación hasta que el flujo retorna a la línea base, AUC). El eje X representa la variación de dosis de anticuerpo G1. “*” indica una $p<0,05$, y “**” indica una $p<0,01$, cuando se compara con el vehículo. Los datos se analizaron utilizando el ANOVA de una dirección y el ensayo de comparación múltiple de Dunn.

10 La figura 8B muestra el efecto de la administración del anticuerpo G1 (0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg, i.v.) o el vehículo (PBS, Tween 20 al 0,01%) sobre el flujo sanguíneo de la piel con respecto al flujo celular sanguíneo después de la estimulación por pulso eléctrico durante 30 segundos 7 días después de la dosificación. El anticuerpo G1 o el vehículo se administró por vía intravenosa (i.v.) 7 días antes de la estimulación nerviosa por pulsos eléctricos. El eje Y representa la AUC total. El eje X representa la variación de dosis de anticuerpo G1. “**” indica una $p<0,01$, y “***” indica una $p<0,001$, cuando se compara con el vehículo. Los datos se analizaron utilizando el ANOVA de una dirección y el ensayo de comparación múltiple de Dunn.

15 La figura 8C es una curva ajustada al análisis de los datos de las figuras 8A y 8B. El anticuerpo o el vehículo se administraron por vía intravenosa (i.v.) bien a las 24 horas o a los 7 días antes de la estimulación nerviosa por pulsos eléctricos. El eje Y representa la AUC total. El eje X representa la variación de dosis del anticuerpo G1 en “mg/kg” sobre una escala logarítmica para determinar la CE_{50} .

20 La figura 9 muestra el efecto del anticuerpo mu7E9 (10 mg/kg), BIBN4096BS o el vehículo (PBS, Tween 20 al 0,01%) en el cambio de diámetro de la arteria meníngea media después de la estimulación por campo eléctrico. Se administraron los anticuerpos mu7E9, BIBN4096BS o el vehículo por vía intravenosa (i.v.) en el punto temporal de 0 minutos después se estableció una respuesta de línea base a la estimulación eléctrica. El eje Y representa el cambio de diámetro de la arteria meníngea media después de la estimulación por campo eléctrico. El diámetro en reposo corresponde con el 0%. El eje X representa el tiempo (en minutos) de la estimulación por pulsos eléctricos. “*” indica una $p<0,05$, y “**” indica una $p<0,01$, cuando se compara con el vehículo. Los datos se analizaron utilizando el ANOVA de una dirección y el ensayo de comparación múltiple de Dunnett.

25 La figura 10 muestra el efecto de varias dosis de anticuerpo G1 (1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg, i.v.) o el vehículo (PBS, Tween 20 al 0,01%) sobre el cambio en el diámetro de la arteria meníngea media después de la estimulación por campo eléctrico. El anticuerpo G1 o el vehículo se administró por vía intravenosa (i.v.) 7 días antes de la estimulación por campo eléctrico. El eje Y representa el cambio en el diámetro de la arteria meníngea media. El diámetro en reposo corresponde con el 0%. El eje X representa el voltaje de estimulación. “*” indica la $p<0,05$, “**” indica la $p<0,01$, y “***” indica la $p<0,001$, cuando se compara con el vehículo. Los datos se analizaron utilizando el ANOVA de dos direcciones y el post-ensayo de Bonferroni.

30 La figura 11A muestra el efecto del anticuerpo mu4901 (10 mg/kg) o el vehículo (PBS, Tween 20 al 0,01%), administrado por vía intravenosa (i.v.) 24 horas antes, sobre el descenso de la temperatura central inducida por inyección subcutánea de naloxona (1 mg/kg) en ratas adictas a la morfina. El eje Y representa la diferencia de temperatura con respecto a la línea base. El eje X representa el tiempo medido desde el punto de la inyección de naloxona.

35 La figura 11B muestra el efecto del anticuerpo mu4901 (10 mg/kg) o el vehículo (PBS, Tween 20 al 0,01%), administrado por vía intravenosa (i.v.) 24 horas antes, sobre el incremento de la temperatura en la superficie de la cola inducida por la inyección subcutánea de naloxona (1 mg/kg) en ratas adictas a la morfina. El eje Y representa la diferencia de temperatura con respecto a la línea base. El eje X representa el tiempo medido desde el punto de la inyección de naloxona.

40

Descripción detallada de la invención

45 La invención que se desvela en el presente documento proporciona una anticuerpo anti CGRP como se describe en el presente documento para su uso en procedimientos para tratar y/o prevenir de los síntomas vasomotores tales como el dolor de cabeza (por ejemplo, migraña, dolor de cabeza en racimo, dolor de cabeza crónico, y dolor de cabeza de tensión) o los sofocos en un individuo administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista anti-CGRP de la invención.

50 La divulgación también proporciona anticuerpos antagonistas anti-CGRP y polipéptidos derivados del G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6. La divulgación también proporciona procedimientos para fabricar y usar estos anticuerpos y polipéptidos.

55 Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleara, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están en la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican ampliamente en la literatura, tal como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y col., 1.989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1.984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1.998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1.987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1.998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1.993-1.998) J. Wiley y Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Cabs, eds., 1.987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col.,

eds., 1.987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis y col., eds., 1.994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan y col., eds., 1.991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley y Sons, 1.999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1.997); Antibodies (P. Finch, 1.997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1.988-1.989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2.000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.999); The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1.995).

Definiciones

10 Un “anticuerpo” es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, un polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., por medio de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se utiliza en el presente documento, el término engloba los anticuerpos policlonales intactos o monoclonales. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA, o IgM (o sub-clases de los mismos), y el anticuerpo no tiene que ser de ninguna clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

25 Como se utiliza en el presente documento, “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. El adjetivo “monoclonal” indica la característica del anticuerpo de 30 que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se construyen como requiere la producción de anticuerpos por un procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan según la presente invención se pueden fabricar por el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495, o puede fabricarse por procedimientos de ADN recombinante tales como los que se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de las bibliotecas de fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty y col., 1.990, *Natur* 648:552-554, por ejemplo.

40 Como se utiliza en el presente documento, anticuerpos “humanizados” se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son quimeras de inmunoglobulinas específicas, cadenas de inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ y otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígenos) que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región complementariamente determinante (CDR) del receptor son remplazados por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, una rata o un conejo que tiene la deseada especificidad, afinidad, y actividad biológica. En algunos casos, los restos de la región Fv marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana son remplazados por los correspondientes restos no humanos. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias armazón, pero que se incluyen para refinar más y optimizar el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, 45 en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son de una secuencia consensuada de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región o dominio constante (Fc) de una inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos pueden tener regiones Fc modificadas como se describe en el documento WO99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR “derivadas de” una o más CDR del anticuerpo original.

55 Como se utiliza en el presente documento, “anticuerpo humano” significa un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o ha sido fabricado utilizando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos conocidas en la técnica o desveladas en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano incluye los anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano de cadena pesada o al menos un polipéptido humano de cadena ligera. Un ejemplo de tales anticuerpos es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y de cadena pesada humana. 60 Los anticuerpos humanos se pueden producir utilizando varias técnicas que se conocen en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, en la que la biblioteca de fagos expresa

anticuerpos humanos (Vaughan y col., 1.996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets y col., 1.998, *PNAS*, (EE.UU) 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1.991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks y col., 1.991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Los anticuerpos humanos también se pueden fabricar introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Esta estrategia se describe en las Patentes de Estados Unidos N°s 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016. De manera alternativa, el anticuerpo humano se puede preparar inmortalizando linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B se pueden recuperar de un individuo o se pueden inmunizar *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1.985); Boemer y col., 1.991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; y 10 Patente de Estados Unidos N° 5.750.373.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “péptido relacionado genéticamente con la calcitonina” y “CGRP” se refieren a cualquier forma de péptido relacionado genéticamente con la calcitonina y variantes del mismo que retienen al menos parte de la actividad del CGRP. Por ejemplo, el CGRP puede ser α -CGRP o β -CGRP. Como 15 se utiliza en el presente documento, el CGRP incluye todas las especies de mamíferos de secuencia CGRP nativa, por ejemplo, humana, canina, felina, equina, y bovina.

Como se utiliza en el presente documento, un “anticuerpo antagonista anti-CGRP” (llamado intercambiablemente “anticuerpo anti-CGRP”) se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse al CGRP e inhibe la actividad biológica 20 del CGRP y/o las rutas corriente abajo mediadas por la señalización de CGRP. Un anticuerpo antagonista anti-CGRP engloba anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (incluso significativamente) la actividad biológica del CGRP, incluyendo las rutas corriente abajo mediadas por la señalización del CGRP, tales como la unión al receptor y/o la obtención de una respuesta celular al CGRP. Para los fines de la presente invención se 25 entenderá explícitamente que la expresión “anticuerpo antagonista anti-CGRP” engloba todos los términos, títulos, y estados funcionales y características previamente identificados por los que el CGRP en sí mismo, una actividad biológica del CGRP (incluyendo, pero sin limitarse a su capacidad para mediar cualquier aspecto del dolor de cabeza), o las consecuencias de la actividad biológica, son sustancialmente anulados, disminuidos, o neutralizados en algún grado significativo. En alguna realización, un anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al CGRP y previene 30 la unión del CGRP al receptor CGRP. En otras realizaciones, un anticuerpo anti-CGRP se une al CGRP y previene la activación del receptor CGRP. Se proporcionan en el presente documento anticuerpos antagonistas anti-CGRP.

Como se utiliza en el presente documento los términos “G1” y “anticuerpo G1” se utilizan intercambiablemente para referirse a un anticuerpo producido por vectores de expresión que tienen los números de depósito de ATCC PTA-6867 y ATCC PTA-6866. La secuencia de aminoácidos de las regiones de cadena ligera y cadena pesada se 35 muestran en la Figura 5. Las porciones CDR del anticuerpo G1 (incluyendo las CDR Chothia y Kabat) se representan como un diagrama en la Figura 5. Los polinucleótidos que codifican las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada se muestran en la SEC. ID N°:9 y la SEC. ID N°:10. La caracterización del G1 se describe en los Ejemplos.

40 Los términos “polipéptido”, “oligopéptido”, “péptido” y “proteína”, se usan intercambiablemente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de puentes disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra 45 manipulación o modificación, tales como la conjugación con un componente de marcado. También se incluyen en la definición, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos están basados en un anticuerpo, los polipéptidos pueden presentarse como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

50 “Polinucleótido”, o “ácido nucleico”, como se utiliza intercambiablemente en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero por la ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos 55 modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si existe, la modificación de la estructura del nucleótido se puede realizar antes o después de ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir con componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse y puede modificarse además después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “caps”, sustitución de uno o más de los nucleótidos presentes de forma natural con un análogo, modificaciones internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellos con uniones no cargadas (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con uniones cargadas (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos pendientes, tales como por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, pty- L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con uniones modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas sin modificar del polinucleótido(s). Además, se pueden 60 65

reemplazar cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores de referencia, o activados para preparar uniones adicionales con nucleótidos adicionales, o puede conjugarse con soportes sólidos. El extremo OH 5' y 3' puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos orgánicos de tapado de desde 1 a 20 átomos de carbono.

- 5 Otros hidroxilos también se pueden derivar de grupos protectores de referencia. Los polinucleótidos también pueden 10 contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2' - O - metil -, 2'- O - alil, 2' - fluoro - o 2' - azido - ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares a-anoméricos, azúcares epiméricos tales como la arabinosa, xilosas o líxosas, azúcares de la piranosa, azúcares de la furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales 15 como el metil ribósido. Se pueden remplazar una o más uniones fosfodiéster por grupos de unión alternativos. Estos grupos alternativos de unión, pero sin limitarse a estos, incluyen realizaciones en las que el fosfato se remplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O) NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O) OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en el cual cada R o R' es independientemente H o un alquil (1 - 20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente una unión éter (- O -), aril, alquenil, cicloalquil, cicloalquenil o araldil. No todas las uniones en un polinucleótido necesitan ser 20 idénticas. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos a que se refiere el presente documento, incluyendo el ARN y el ADN.

- Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, sea sola o en combinación. Las regiones variables de cada cadena pesada y ligera consisten de cuatro regiones marco conservadas (FR) conectadas por tres regiones complementariamente determinantes (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Hay al menos dos técnicas para determinar CDR: (1) una estrategia basada en la variabilidad de la secuencia cruzada entre especies (es decir, Kabat y col. Sequences of 25 Proteins of Immunological Interest, (5^a ed., 1.991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) una estrategia basada en estudios de cristalografía de los complejos antígeno-anticuerpo (Al- Iazikani y col (1.997) J. Molec. Biol. 273: 927- 948)). Como se utiliza en el presente documento, una CDR se puede referir a CDR definidas por cada estrategia o por una combinación de ambas estrategias.

- 30 Una "región constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de cadena ligera del anticuerpo o la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, tanto sola o en combinación.

- 35 Un epítopo que "se une preferencialmente" o "se une específicamente" (utilizado intercambiablemente en el presente documento) a un antibiótico o a un polipéptido es un término bien entendido en la técnica, y los procedimientos para determinar tales uniones específica o preferencial también son bien conocidas en la técnica. Una molécula se dice que muestra "unión específica" o "unión preferencial" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula en particular o una sustancia de lo que lo hace con sustancias o células alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferencialmente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración de lo que se une a otras 40 sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferencialmente a un epítopo CGRP es un anticuerpo que se une a este epítopo con más afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración de lo que se une a otros epítopos CGRP o epítopos no CGRP. También se comprende leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítopo) que se une específica o preferencialmente a una primera diana puede o no unirse 45 específicamente o preferencialmente a una segunda diana. Como tal, "unión específica" o "unión preferencial" no necesariamente necesita (aunque se puede incluir) una unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferencial.

- 50 Como se utiliza en el presente documento, "sustancialmente puro" se refiere al material que es al menos un 50% puro (es decir, libre de contaminantes), más preferentemente al menos un 90% puro, más preferentemente al menos un 95% puro, más preferentemente al menos un 98% puro, más preferentemente al menos un 99% puro.

- 55 Una "célula huésped" incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido receptora de vector(es) para la incorporación de insertos de polinucleótidos. Las células huésped incluyen la progenie de una única célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en el complemento genómico ADN) a la célula parental original debido a mutación natural, accidental, o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas in vivo con un polinucleótido(s) de esta invención.

- 60 La expresión "región Fc" se utiliza para definir la región terminal-C de una cadena pesada de una inmunoglobulina. La "región Fc" puede ser una región Fc de secuencia nativa o una variante de región Fc. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de una inmunoglobulina puede variar, la región Fc de cadena pesada de la IgG humana normalmente se define por estirarse desde un resto aminoacídico en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo de la misma. La numeración de los restos en la región Fc es la del índice UE como en el de Kabat. Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1.991. La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios 65 constantes, CH2 y CH3.

Como se utiliza en el presente documento, "receptor Fc" y "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es una secuencia FcR humana nativa. Además, un FcR preferido es el que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores del Fc_γRI, Fc_γRII, y subclases del Fc_γRII, incluyendo variantes alélicas y formas de empalme de estos receptores. Los receptores Fc_γRII incluyen el Fc_γRIIA (un "receptor activador") y Fc_γRIIB (un "receptor inhibidor"), que tiene secuencias de aminoácidos similares que se diferencian primariamente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, 1.991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel y col., 1.994, Immunomethods, 4:25-34; y de Haas y col., 1.995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41. "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternales al feto (Guyer y col., 1.976, J. Immunol., 117:587; y Kim y col., 1.994, J. Immunol., 24:249).

5 "Toxicidad dependiente del complemento" y "CDC" se refiere a la destrucción de una diana en presencia del complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) que forma un complejo con un antígeno afín. Para 10 evaluar la activación del complemento se puede llevar a cabo un ensayo CDC, por ejemplo como el que se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods, 202:163 (1.996).

15 Una "región funcional Fc" posee al menos una función de efecto de una secuencia nativa de región Fc. Las "funciones de efecto" ejemplarizadas incluyen la unión C1q; la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); la 20 unión al receptor Fc; la toxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); la fagocitosis; la regulación negativa de los receptores celulares de superficie (por ejemplo, el receptor de células B; BCR), etc. Tales 25 funciones efectoras necesitan generalmente la región Fc para combinarse con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se puede evaluar utilizando varios ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras del anticuerpo.

30 35 Una "secuencia nativa de la región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la de una secuencia nativa de una región Fc en virtud de la modificación de al menos un aminoácido, que todavía retiene al menos una función efectora de la secuencia nativa de la región Fc. Preferentemente, la región variante Fc tiene al menos una sustitución de un aminoácido comparado con una secuencia nativa de región Fc o la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácido, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácido en una secuencia nativa Fc o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en el presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente el 80 de identidad de secuencia con la secuencia nativa de la región Fc y/o con una región Fc de un polipéptido parental y más preferentemente al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con aquellos.

40 Como se utiliza en el presente documento "toxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo células citolíticas naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen la unión del anticuerpo a una célula diana y posteriormente produce la destrucción de la célula diana. La actividad ADCC de una molécula de interés se puede evaluar utilizando un ensayo *in vitro* ADCC, tal como el que se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las células NK. De manera alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como es que se desvela en Clynes y col., 1.998, PNAS (USA), 95:652-656.

45 55 Como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" es una estrategia para obtener los resultados clínicos 50 beneficiosos o deseados. Para los propósitos de esta invención, los resultados beneficiosos o deseados incluyen, sin que estén limitados a estos, uno o más de los siguientes: mejoría en cualquier aspecto de un dolor de cabeza incluyendo la disminución de la gravedad, el alivio de la intensidad del dolor, y otros síntomas asociados, reducción de la frecuencia o recurrencia. Aumento de la calidad de vida de los que sufren de dolores de cabeza, y descenso de la dosis de otras medicaciones requeridas para tratar el dolor de cabeza. Para la migraña, otros síntomas asociados incluyen, pero no se limitan a estos, náuseas, vómitos y sensibilidad a la luz, el ruido y/o el movimiento. Para el dolor de cabeza en racimo, otros síntomas asociados incluyen, pero no se limitan a estos, inflamación bajo y alrededor de los ojos, lagrimeo excesivo, ojo rojo, rinorrea o congestión nasal y enrojecimiento de la cara.

60 65 La "reducción de la incidencia" de un dolor de cabeza significa cualquier reducción de la gravedad (lo que puede 60 incluir la reducción de la necesidad y/o la cantidad de (por ejemplo, la exposición a) otros fármacos y/o terapias que se utilizan generalmente para esta afección, incluyendo por ejemplo, ergotamina, dihidroergotamina, o triptano para la migraña), la duración, y/o la frecuencia (incluyendo, por ejemplo, el retraso o el aumento de tiempo hasta el próximo ataque episódico en un individuo). Como comprenden aquellos expertos en la técnica, los individuos pueden variar en términos de su respuesta al tratamiento y, como tal, por ejemplo, un "procedimiento para reducir la incidencia del dolor de cabeza en un individuo" refleja la administración de un anticuerpo antagonista anti-CGRP basado en unas expectativas razonables de que tal administración puede producir probablemente una reducción de la incidencia en ese individuo en particular.

"Mejoría" del dolor de cabeza o uno o más síntomas del dolor de cabeza significa una disminución o mejoría de uno o más síntomas del dolor de cabeza cuando se compara con la no administración de un anticuerpo antagonista anti-CGRP. "Mejoría" también incluye el acortamiento o reducción en la duración de un síntoma.

5 Como se utiliza en el presente documento, "controlar el dolor de cabeza" se refiere a mantener o reducir la gravedad o la duración de uno o más síntomas del dolor de cabeza o la frecuencia de los ataques de dolor de cabeza en un individuo (cuando se compara con el nivel de antes del tratamiento). Por ejemplo, la duración o la gravedad del dolor de cabeza, o la frecuencia de los ataques se reduce al menos aproximadamente cualquiera de un 10%, 20% 30%, 10 40%, 50%, 60%, o 70% en el individuo cuando se compara con el nivel antes del tratamiento.

Como se utiliza en el presente documento, "retrasar" el desarrollo del dolor de cabeza significa diferir, atrasar, enlentecer, retrasar, estabilizar y/o posponer la progresión de la enfermedad. Este retraso puede ser de longitudes de tiempo variables, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o los individuos que sean tratados. Como es evidente para un experto en la técnica, un retraso significativo o suficiente puede, en efecto, englobar la prevención, en que el individuo no desarrolle dolor de cabeza (por ejemplo, migraña). Un procedimiento que "retrasa" el desarrollo de los síntomas es un procedimiento que reduce la probabilidad de desarrollar los síntomas en un marco de tiempo determinado y/o reduce la extensión de los síntomas en un marco de tiempo determinado, cuando se compara con los que no utilizan el procedimiento. Tales comparaciones se basan típicamente en estudios clínicos, 20 utilizando un número estadísticamente significativo de sujetos.

25 "Desarrollo" o "progresión" de un dolor de cabeza, significa manifestaciones iniciales y/o consiguiente progresión del trastorno. El desarrollo del dolor de cabeza puede ser detectable y evaluable utilizando técnicas clínicas de referencia que se conocen bien en la técnica. Sin embargo, el desarrollo también se refiere a la progresión que puede ser indetectable. Como propósito de esta invención, desarrollo o progresión se refiere al curso biológico de los síntomas. "Desarrollo" incluye que ocurrencia, recurrencia, y aparición, Como se utiliza en el presente documento "aparición" o "ocurrencia" de un dolor de cabeza incluye la aparición inicial y/o la recurrencia.

30 Como se utiliza en el presente documento, una "dosis eficaz" o una "cantidad eficaz" del fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar los resultados beneficiosos o deseados. Para su uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados, incluyen resultados tales como la eliminación o reducción del riesgo, disminución de la gravedad, o retraso de la aparición de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento, de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermediarios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para su uso terapéutico, los resultados 35 beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como la reducción de la intensidad del dolor, duración, o frecuencia de los ataques de dolor de cabeza, y la disminución de uno o más síntomas que dan lugar al dolor de cabeza (bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento), incluyendo sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad, aumentando la calidad de vida de los que sufren esta enfermedad, disminuyendo la dosis de otras medicaciones que se necesiten para tratar la 40 enfermedad, aumentando el efecto de otra medicación, y/o retrasando la progresión de la enfermedad de los pacientes. Una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para conseguir el tratamiento profiláctico o terapéutico sea directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no alcanzarse en conjunción con otro fármaco, compuesto, o composición farmacéutica. Por tanto "una dosificación 45 eficaz" puede considerarse en el contexto de que se administre uno o más agentes terapéuticos, y un único agente, se puede considerar que se da en una cantidad eficaz si, en conjunción con uno o más agentes, se puede alcanzar o se alcanza un resultado deseable.

50 Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos también incluyen, aunque no se limitan a estos, animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas.

55 Como se utiliza en el presente documento, un "vector" significa una construcción, que es capaz de suministrar, y preferentemente expresar, uno o más gen(es) o secuencia(s) de interés en una célula huésped. Ejemplos de vectores incluyen, pero sin estar limitados a estos, vectores víricos, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, plásmidos, cósmidos o vectores fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónica, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucariotas, tales como las células productoras.

60 Como se utiliza en el presente documento, "secuencia de control de la expresión" significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. La expresión de la secuencia de control está unida operativamente a la secuencia del ácido nucleico a trascibirse.

65 Como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un principio activo, permite al ingrediente retener

la actividad biológica y no es reactivo con el sistema inmune del sujeto. Ejemplos de esto incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos de referencia tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como la emulsión de aceite/agua, y varios tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para la vía por aerosol o la administración parenteral son solución salina tamponada con fosfato o normal (0,9%). Las composiciones que comprenden tales vehículos se formulan por procedimientos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co.; Easton, PA, 1.990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. Mack Publishing, 2.000).

10 El término " k_{on} ", como se utiliza en el presente documento, se entiende que se refiere a la tasa de la constante de asociación de un anticuerpo a un antígeno.

15 El término " k_{off} ", como se utiliza en el presente documento, se entiende que se refiere a la tasa de la constante de disociación de un anticuerpo desde un complejo antígeno/anticuerpo.

15 El término " K_D ", como se utiliza en el presente documento, se entiende que se refiere al equilibrio de la constante de disociación de la interacción antígeno-anticuerpo.

20 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "síntoma vasomotor", se entiende que se refiere a las condiciones relacionadas con la vasodilatación e incluye, pero sin limitación, al dolor de cabeza (tal como la migraña,otros), los sofocos (o flashes de calor), flashes fríos, insomnio, alteraciones del sueño, trastornos anímicos, irritabilidad, transpiración excesiva, sudoración nocturna, sudoración diurna, fatiga y similares, causados por, entre otras, una disfunción termorreguladora.

25 Como se utiliza en el presente documento, los términos "rubefacción", "sofoco" y "bochorno" son términos reconocidos en la técnica que se refieren a alteraciones episódicas en la temperatura corporal que consisten típicamente en una rubefacción repentina de la piel, normalmente acompañada por transpiración en un sujeto.

30 A. Procedimientos para prevenir o tratar los síntomas vasomotores

30 En un aspecto, la invención proporciona el anticuerpo para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención de dolor de cabeza (por ejemplo, la migraña), en un individuo que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de anticuerpo antagonista anti-CGRP definido en el presente documento.

35 Aquellos expertos en la técnica serán capaces de determinar las cantidades apropiadas de dosificación para los agentes en particular a utilizarse en combinación con un anticuerpo anti-CGRP. Por ejemplo, el sumatriptano se puede administrar en una dosificación de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 300 mg. Cuando se administra no por vía parenteral, la dosificación de sumatriptano es de aproximadamente 25 a aproximadamente 100 mg con una dosis favorita de aproximadamente 50 mg y, cuando se administra por vía parenteral, la dosificación preferida es de aproximadamente 6 mg. Sin embargo, estas dosificaciones pueden variarse de acuerdo con los procedimientos de referencia en la técnica para que se optimicen para un paciente en particular o para una terapia de combinación en particular. Además, por ejemplo, el celecoxib puede administrarse en una cantidad de entre 50 y 500 mg.

45 Con respecto a todos los procedimientos descritos en el presente documento, la referencia a los anticuerpos antagonistas anti-CGRP también incluyen composiciones que comprenden uno o más de estos agentes. Estas composiciones pueden además comprender excipientes adecuados tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que son bien conocidos en la técnica. La presente invención se puede utilizar sola o en combinación con otros procedimientos convencionales de tratamiento.

50 El anticuerpo antagonista anti-CGRP se puede administrar a un individuo por medio de cualquier vía adecuada. Debería ser patente para una persona experta en la técnica que los ejemplos descritos en el presente documento no intentan ser limitantes sino que son ilustrativos de las técnicas disponibles. En consecuencia, en algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se administra a un individuo según procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, sublingual, intrasinovial, vía insuflación, intratecal, oral, por inhalación o por vía tópica. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa, o localizada. Los nebulizadores disponibles comercialmente para formulaciones líquidas, incluyendo los nebulizadores en jet y los nebulizadores ultrasónicos se útiles para la administración. Las formulaciones líquidas pueden nebulizarse directamente y el polvo liofilizado se puede nebulizar tras su reconstitución. De manera alternativa, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se pueden aplicar por aerosol utilizando una formulación en fluorocarbono y un inhalador de una dosis determinada, o puede inhalarse como un liofilizado y un molido en polvo.

65 En una realización, un anticuerpo antagonista anti-CGRP se administra por medio de técnicas de especificidad de sitio o de suministro local dirigido. Ejemplos de técnicas de sitio específico o de suministro local dirigido incluyen varias fuentes de depósito implantables del anticuerpo antagonista anti-CGRP y catéteres de suministro local, tales

como catéteres de infusión, un catéter permanente, o una aguja de catéter, injertos sintéticos, vendas adventicias, derivaciones y endoprótesis vasculares u otros dispositivos implantables, vehículos específicos, inyección directa, o aplicación directa. Véase por ejemplo, la publicación PCT Nº WO 00/53211 y Patente de Estados Unidos Nº 5.981.568.

5 Varias formulaciones de un anticuerpo antagonista anti-CGRP se pueden utilizar para la administración. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se puede administrar puro. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP y un excipiente farmacéuticamente aceptable puede estar en varias formulaciones. Los excipientes farmacéuticos aceptable se conocen en la técnica, y son sustancias relativamente 10 inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como un diluyente. Los excipientes adecuados incluyen pero sin limitarse a agentes estabilizantes, humectantes y agentes emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes encapsulantes, tampones, y mejoradores de la penetración en la piel. Los excipientes así como las formulaciones para el suministro parenteral y no parenteral del fármaco se exponen en Remington, The Science and Practice of 15 Pharmacy 20^a Ed. Mack Publishing (2.000).

En algunas realizaciones, estos agentes se formulan para su administración por inyección (por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). En consecuencia, estos agentes se pueden combinar con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y 20 similares. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, la hora y la repetición, dependerán del individuo en particular y la historia médica del individuo.

Un anticuerpo anti-CGRP se puede administrar utilizando cualquier procedimiento, incluyendo por inyección (por 25 ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). Los anticuerpos anti-CGRP también se pueden administrar por vía inhalatoria, como se describe en el presente documento. Generalmente, para la administración de anticuerpos anti-CGRP, una dosis candidata inicial puede ser aproximadamente de 2 mg/kg. Para los propósitos de la presente invención, una típica dosis diaria puede variar de aproximadamente 3 µg/kg a 30 µg/kg 30 a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede utilizar una dosificación de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, y aproximadamente 25 mg/kg. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca una supresión de los síntomas como se desea o hasta que se alcanzan suficientes niveles terapéuticos, por ejemplo, reducir el dolor. Un régimen de dosificación ejemplar comprende la administración de una dosis inicial de 35 aproximadamente 2 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanalmente de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo anti-CGRP, o seguida por una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada otra semana. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de desintegración farmacocinético que el médico desee alcanzar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se contempla la dosificación de una-cuatro veces a la semana. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (incluyendo el antagonista(s) CGRP utilizado) puede variar con el 40 tiempo.

Para el propósito de la presente invención, la dosificación apropiada de un anticuerpo antagonista anti-CGRP dependerá del anticuerpo antagonista anti-CGRP (o composiciones del mismo) que se emplee, el tipo y la gravedad del dolor de cabeza (por ejemplo, migraña) a tratarse, de si el agente se administra con propósitos preventivos o 45 terapéuticos, de las terapias previas, de la historia clínica del paciente y de la respuesta por el agente, y la discreción del médico encargado. Típicamente, el médico administrará un anticuerpo antagonista anti-CGRP, hasta que se alcance una dosificación que consiga el resultado deseado. La dosis y/o la frecuencia pueden variar con el curso del tratamiento.

50 Generalmente, contribuirán consideraciones empíricas, tales como la vida media, para la determinación de la dosificación. Por ejemplo, los anticuerpos que son compatibles con el sistema inmune humano, tales como los anticuerpos humanizados o anticuerpos totalmente humanos, se pueden utilizar para prolongar la vida media del anticuerpo y para prevenir que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmune del huésped. La frecuencia de administración se puede determinar y ajustar durante el curso de la terapia, y está generalmente, pero no necesariamente, basad en el tratamiento y/o la supresión y/o la mejoría y/o el retraso del dolor de cabeza (por ejemplo, la migraña). De manera alternativa, pueden ser apropiadas las formulaciones de liberación sostenida continua del anticuerpo antagonista anti-CGRP. Varias formulaciones y dispositivos para conseguir una liberación sostenida, se conocen en la técnica.

60 En una realización, las dosificaciones para un anticuerpo antagonista anti-CGRP se pueden determinar empíricamente en individuos a los que se les ha dado una o más administraciones de un anticuerpo antagonista anti-CGRP. A los individuos se les dan dosis crecientes de un anticuerpo antagonista anti-CGRP. Para evaluar la eficacia de un anticuerpo antagonista anti-CGRP, se puede seguir un indicador de la enfermedad.

65 La administración de un anticuerpo antagonista anti-CGRP de acuerdo con el procedimiento de la presente invención puede ser continuo o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del receptor, de si el

propósito de la administración es terapéutica o profiláctica, y otros factores conocidos por los médicos expertos. La administración de un anticuerpo antagonista anti-CGRP puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en serie de dosis espaciadas, por ejemplo, o bien antes, durante, o después del desarrollo del dolor de cabeza (por ejemplo, migraña); antes; durante; antes y después, durante y/o después de cualquier evento que probablemente produzca la aparición de un dolor de cabeza.

En algunas realizaciones, están presentes más de un anticuerpo antagonista anti-CGRP. Pueden estar presentes al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco diferentes, o más anticuerpos antagonistas anti-CGRP. Generalmente, estos anticuerpos antagonistas anti-CGRP pueden tener actividades complementarias que no afectan de manera adversa a los otros. Un anticuerpo antagonista anti-CGRP también se puede utilizar en conjunción con otros antagonistas CGRP o antagonistas del receptor CGRP. Por ejemplo, uno o más de los siguientes antagonistas del CGRP se pueden utilizar: una molécula antisentido dirigida a un CGRP (incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica el CGRP), un compuesto inhibidor de CGRP, un análogo estructural del CGRP, una mutación dominante negativa de un receptor del CGRP que se une a un CGRP, y un anticuerpo antagonista anti-CGRP. Un anticuerpo antagonista anti-CGRP también se puede utilizar en conjunción con otros agentes que sirven para aumentar y/o complementar la eficacia de los agentes.

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo antagonista anti-CGRP que se utiliza de acuerdo con la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene un grado deseado de pureza, opcionalmente con vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizantes (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. Mack Publishing (2.000)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y pueden comprender tampones tales como el fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro sódico; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como el cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol bencílico o butílico; alquilparabenos, tales como el metil o el propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol; 3 – pentanol, y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la seroalbúmina, la gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como la polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como la glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como el EDTA; azúcares tales como la sacarosa, el manitol, la trehalosa o el sorbitol; iones que cuentan a la hora de formar sales, tales como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

Los liposomas que se preparan por procedimientos conocidos en la técnica, tales como los que se describen en Epstein, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 82:3688 (1.985); Hwang, y col., Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU 77: 4030 (1.980); y Patente de Estados Unidos N° 4.485.045 and 4.544.545. Los liposomas que favorecen el tiempo de circulación se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556. Se pueden generar liposomas particularmente útiles por el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

Los principios activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y de poli(metil-metacrilato) respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. Mack Publishing (2.000).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrofóbicos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos de ciertas formas, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen los poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), or'poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, acetato de vinil etileno no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico - ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), acetato isobutirato de sacarosa, y poli-D-(–)-3-ácido hidroxibutírico.

Las formulaciones para ser usadas en la administración in vivo se deben esterilizar. Esto se consigue fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas estériles de filtración. Las composiciones terapéuticas de anticuerpo antagonista anti-CGRP generalmente se colocan en un envase que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden estar en forma de unidades de dosificación, tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones, o supositorios, para administración oral, parenteral o rectal, o se administran por inhalación o insuflación.

- Para preparar las composiciones sólidas tales como comprimidos, el principal principio activo se mezcla con un vehículo farmacéutico, por ejemplo, los ingredientes convencionales de los comprimidos, tales como el almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato magnésico, fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo agua, para formar una pre-formulación sólida de una composición que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable del mismo. Cuando se refiere a estas pre-formulaciones d composiciones como homogéneas, significa que el principio activo está disperso por toda la composición de forma que la composición se puede fácilmente subdividir en formas unitarias de dosificación igualmente eficaces, tales como comprimidos, píldoras y cápsulas,
- 5 Esta pre-formulación sólida de la composición se subdivide entonces en formas de dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen de 0,1 a aproximadamente 500 mg del principio activo de la presente invención. Las tabletas o píldoras de la nueva composición se pueden recubrir o componer de alguna otra manera para proporcionar una forma de dosificación que consiga la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o la píldora pueden comprender una componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo, este último está en forma de envoltura sobre el formador. Los dos componentes se pueden separar por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite al componente interno pasar intacto al duodeno o retrasarse su liberación. Una variedad de materiales se pueden utilizar para estas capas entéricas o revestimientos, tales materiales incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con tales materiales como goma laca, cetil alcohol y acetato de celulosa.
- 10
- 15
- 20 Los agentes activos de superficie adecuados incluyen, en particular, agentes no iónicos, tales como polioxitetilensorbitanos (por ejemplo Tween™ 20, 40, 60, 80 o 85) y otros sorbitanos (por ejemplo Span™ 20, 40, 60, 80, o 85). Las composiciones con un agente activo de superficie comprenderán convenientemente entre 0,05 y el 5% de agentes activos de superficie, y puede ser entre el 0,1 y el 2,5%. Se apreciará que se pueden añadir otros ingredientes, por ejemplo el manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables, si fuera necesario.
- 25
- 30 Las emulsiones adecuadas se pueden preparar utilizando emulsiones grasas disponibles comercialmente, tales como Intralipid™, Infonutrol™, Lipofundin™ y Lipiphysan™. El principio activo puede ser disuelto en una emulsión de la composición premezclada o de manera alternativa puede disolverse en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendra) y una emulsión formada mezclando con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos del huevo, fosfolípidos de soja, o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que otros ingredientes se pueden añadir, por ejemplo, glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas típicamente contendrán hasta un 20% de aceite, por ejemplo, entre un 5 y un 20%. La emulsión de grasa puede comprender gotitas de grasa entre 0,1 y 1,0 lm, particularmente 0,1 y 0,5 lm, y tiene un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0.
- 35
- 40 Las composiciones de la emulsión pueden ser las preparadas mezclando un anticuerpo antagonista anti-CGRP con Intralipid™ o los componentes del mismo (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).
- 45
- 50 Las composiciones por inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en un disolvente farmacéuticamente aceptable acuoso u orgánico, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables como se expuso anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía oral o nasal respiratoria para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes estériles farmacéuticamente aceptables que pueden nebulizarse con la utilización de gases. Las composiciones para nebulizarse se pueden respirar directamente del dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización se puede acoplar a una máscara facial, una tienda o una máquina de respiración de presión positiva intermitente. Las composiciones en suspensión o en polvo se pueden administrar, preferiblemente por vía oral o nasal, a con dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada.
- 55
- 60 El diagnóstico o evaluación del dolor de cabeza están bien establecidos en la técnica. La evaluación se puede llevar a cabo basándose en valoraciones subjetivas, tales como la caracterización de los síntomas del paciente. Por ejemplo, la migraña se puede diagnosticar basándose en los siguientes criterios: 1) Ataques episódicos de dolor de cabeza que duran entre 4 o 72 horas; 2) con dos de los siguientes síntomas: dolor unilateral, punzante, que se agrava con el movimiento, y dolor de intensidad moderada o fuerte; y 3) uno de los siguientes síntomas: náusea o vómitos, y fotofobia o fonofobia. Goadsby y col., N. Engl. J. Med. 346:257-270, 2002.
- La eficacia del tratamiento se puede evaluar por procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede evaluar el alivio del dolor. En consecuencia, en algunas realizaciones, el alivio del dolor se observa subjetivamente después de 1, 2, o unas cuantas horas después de la administración de un anticuerpo anti-CGRP. En algunas realizaciones, la frecuencia de los ataques de dolor de cabeza se observa subjetivamente después de la administración de un anticuerpo anti-CGRP.
- B. Anticuerpos antagonistas anti-CGRP
- 65 La invención se refiere al uso de un anticuerpo antagonista anti-CGRP, que se refiere a cualquier molécula de anticuerpo que bloquea, suprime o reduce (incluyendo significativamente) la actividad biológica del CGRP,

incluyendo las rutas corriente abajo mediadas por la señalización del CGRP, tales como la unión al receptor y/o la provocación de una respuesta celular al CGRP.

5 Un anticuerpo antagonista anti-CGRP debería mostrar cualquiera o más de las siguientes características: (a) unión al CGRP; (b) bloqueando la unión del CGRP a su receptor(es); (c) bloqueando o disminuyendo la activación del receptor CGRP (incluyendo la activación del cAMP); (d) inhibiendo la actividad biológica del CGRP o la función de las rutas corriente abajo mediadas por la señalización del CGRP; (e) prevención, mejoría, o tratamiento de cualquier aspecto del dolor de cabeza (por ejemplo, la migraña); (f) aumento del aclaramiento de CGRP; y (g) inhibición (reducción) de la síntesis de CGRP, su producción o liberación. Los anticuerpos antagonistas anti-CGRP se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Tan y col., Clin. Sci. (Lond). 89:565-73, 1.995; Sigma (Missouri, US), número de producto C7113 (clone nº4901); Plourde y col., Peptides 14:1225-1229, 1.993.

10 Para los propósitos de esta invención, el anticuerpo reacciona con el CGRP de manera que inhibe al CGRP y/o la función de las rutas corriente abajo mediadas por señalización del CGRP. En algunas realizaciones el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une a ambos α -CGRP y β -CGRP. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al CGRP humano y de rata. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al epítopo del extremo C con los aminoácidos 25-37 de CGRP.

15 20 Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden englobar anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida, incluyendo las variantes de anticuerpos por glicosilación, las variantes de anticuerpos por la secuencia de aminoácidos, o los anticuerpos modificados covalentemente.

25 30 35 En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP está humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es humano. En algunas realizaciones el anticuerpo antagonista anti-CGRP en el anticuerpo G1 (como se describe en el presente documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende una o más CDR(s) (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o , en algunas realizaciones las seis CDR) del anticuerpo G1 o variantes del G1 que se muestran en la Tabla 6. En otras realizaciones más, el anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra en la Figura 5 (SEC. ID Nº: 1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se muestra en la Figura 5 (SEC. ID Nº: 2).

40 45 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región que es inerte inmunológicamente descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1.999) 29:2613-2624; y el documento W099/58572. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante IgG2 humana de cadena pesada que comprende las siguientes mutaciones; A330P331 a S330S331 (numerando los aminoácidos en referencia a la secuencia de la IgG2 de tipo silvestre). Eur. J. Immunol. (1.999) 29:2613-2624. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG4 que comprende las siguientes mutaciones: E233F234L235 a P233V234A235. En otras realizaciones más, la región constante está glicosilada por glicosilación unida a N. En algunas realizaciones, la región constante está glicosilada por glicosilación unida a N por mutación del resto de fijación oligosacárido (tal como el Asn297) y/o los restos que lo flanquean que son parte de la secuencia de reconocimiento de la glicosilación N de la región constante. En algunas realizaciones, la región constante está glicosilada por glicosilación unida a N. La región constante puede aglucosilarse por la glicosilación unida a N enzimáticamente o por expresión en una célula huésped con glicosilación deficiente.

50 55 60 65 Una manera de determinar la afinidad de unión de los anticuerpos al CGRP es midiendo la afinidad de unión de fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener los fragmentos monofuncionales, un anticuerpo por ejemplo, una IgG) se escinde con papaína o se expresa recombinantemente. La afinidad de un fragmento Fab anti-CGRP de un anticuerpo se puede determinar por resonancia de plasmones de superficie (sistema de resonancia de plasmones de superficie Biacore3000™ (SPR), Biacore, INC, Piscataway NJ) equipado con chips sensores pre-inmovilizados con estreptavidina (SA) utilizando un tampón de realización HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 al 0,005% v/v). El CGRP humano biotinilado (o cualquier otro CGRP) se puede diluir en tampón HBS-EP a una concentración de menos de 0,5 ug/ml y se inyecta a través de los canales individuales de los chips utilizando tiempos variables de contacto, para conseguir dos intervalos de densidad del antígeno, tanto de 50-200 unidades de respuesta (RU) para estudios cinéticos detallados, o de 800-1000 RU para ensayos de selección. Los estudios de regeneración han demostrado que la NaOH 25 mM en etanol al 25% v/v elimina eficazmente la unión Fab aunque manteniendo la actividad del CGRP en el chip para más de 200 inyecciones. Típicamente, las diluciones seriadas (concentraciones que abarcan de 0,1-10x de la K_D estimada) de las muestras Fav se inyectan durante un min a 100 μ l/minuto y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 horas. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan por ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE utilizando un Fab de concentración conocida (como se determina por el análisis de aminoácidos) como una referencia. Las tasas cinéticas de asociación (k_{on}) y la tasa de disociación (k_{off}) se obtienen simultáneamente ajustando los datos globalmente a un modelo de unión Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1.994). Methods Enzymology 6. 99-110) utilizando el programa BIAevaluation. Los valores de equilibrio de la constante de

disociación (K_D) se calculan como k_{off}/k_{on} . Este protocolo se usa adecuadamente para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier CGRP, incluyendo el CGRP humano, el CGRP de otro mamífero (tal como el CGRP de ratón, el CGRP de rata, el CGRP de primates), así como diferentes formas de CGRP (tal como las formas α y β). La afinidad de unión de un anticuerpo generalmente se mide a 25 °C, pero también se puede medir a 37 °C.

5 Los anticuerpos antagonistas anti-CGRP pueden hacerse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. La vía y el calendario de inmunización del animal hospedador son generalmente mantenidos con las técnicas establecidas y convencionales para la estimulación por anticuerpos y la producción, como además se describe en el presente documento. Las técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón se conocen en la técnica 10 y se describen en el presente documento.

15 Se contempla que cualquier sujeto mamífero incluyendo los seres humanos o las células que producen anticuerpos de los mismos pueden manipularse para servir de base para la producción de líneas celulares de hibridoma de mamífero, incluyendo las humanas. Típicamente, el animal huésped se inocula por vía intraperitoneal, intramuscular, 20 oral, subcutánea, intraplantar, y/o intradérmica con una cantidad de inmunógeno, incluyendo como lo descrito en el presente documento.

25 Los hibridomas se pueden preparar a partir de linfocitos y células de mieloma inmortalizadas, utilizando la técnica de hibridación somática general de Kohler, B. y Milstein, C. (1975) Nature 256:495-497 o como la modificada por Buck, 30 D. W., y col., In Vitro, 18:377-381 (1.982). Las líneas de mieloma disponibles, incluyendo pero sin limitación X63-Ag8.653 y las del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EE.UU., se pueden utilizar en la hibridación. Generalmente, la técnica implica la fusión de las células de mieloma y las células linfoides utilizando un generador de fusión tal como el polietilenglicol, o por medios eléctricos bien conocidos por los expertos en la técnica. 35 Después de la fusión. Las células se separan del medio de fusión y se cultivan en un medio selectivo de crecimiento, tal como el medio hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), para eliminar las células parentales no hibridadas. Se pueden utilizar cualquiera de los medios descritos en el presente documento, suplementado con o sin suero para cultivar hibridomas que segreguen anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa como técnica de fusión celular, se puede utilizar la EBV. células parentales B inmortalizadas para producir anticuerpos monoclonales anti-CGRP de la invención. Los hibridomas se expanden y subclonian, si se quiere, y los sobrenadantes se ensayan para su actividad anti-inmunógena por procedimientos convencionales de inmunoensayo (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático, o inmunoensayo de fluorescencia).

40 Los hibridomas que se pueden utilizar como fuente de anticuerpos engloban todos los derivados, células de la progenie del hibridoma parental que producen anticuerpos monoclonales específicos para el CGRP, o una parte de los mismos.

45 Los hibridomas que producen tales anticuerpos pueden cultivarse in vitro o in vivo utilizando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar, si se desea, del medio de cultivo o de fluidos corporales, por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como precipitación en sulfato amónico, electroforesis en gel, diálsis, cromatografía, y ultrafiltración. Si se presenta una actividad indeseable, se puede 50 eliminar, por ejemplo, pasando la preparación sobre adsorbentes hechos del inmunógeno fijado a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados fuera del inmunógeno. La inmunización de un animal hospedador con un CGRP humano, o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácido diana conjugada con una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizarse, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de la tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación por medio de los restos cisteína), N-hidroxisuccinimida (por medio de los restos de lisina), glutaraldehido, anhídrido succínico, SOCl₂ o R1 N=C=NR, donde R y R1 son distintos grupos alquilo, pueden producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

55 55 Si se desea, el anticuerpo antagonista anti-CGRP (monoclonal o policlonal) de interés se puede secuenciar y la secuencia de polinucleótidos se puede entonces clonar en un vector por expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés se puede mantener en el vector en una célula huésped y la célula huésped puede entonces expandirse y congelarse para su uso en el futuro. Como alternativa, la secuencia de polinucleótidos puede utilizarse por modificación genética para "humanizar" el anticuerpo o para mejorar la afinidad, u otras características 60 del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante se puede manipular para parecerse más a las regiones constantes humanas y evitar la respuesta inmune si el anticuerpo se utiliza en ensayos clínicos y tratamientos en humanos. Puede ser deseable modificar genéticamente la secuencia del anticuerpo para obtener mayor afinidad al CGRP y mayor eficacia para inhibir al CGRP. Será aparente para un experto en la técnica que se pueden hacer uno o más cambios de polinucleótidos al anticuerpo antagonista anti-CGRP y que mantenga aún su capacidad de unión al CGRP.

65 Hay cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar el nucleótido y predecir la secuencia de aminoácidos del iniciador de los dominios variables ligero y pesado del anticuerpo (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir cuál región marco conservada del anticuerpo se usará durante el proceso de humanización (3) las técnicas/metodologías actuales de humanización y (4) la transfección y la expresión del anticuerpo humanizado. Véase por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N°s 4.816.567; 5.807.715;

5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

Se han descrito varias moléculas de anticuerpos "humanizados" que comprenden el sitio de unión al antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen las regiones V de roedores o modificadas de roedores y sus regiones complementariamente determinantes (CDR) asociadas fusionadas con dominios constantes humanos. Véase, por ejemplo, Winter y col. *Nature* 349:293-299 (1.991), Lobuglio y col. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224 (1.989), Shaw y col. *J Immunol.* 138:4534-4538 (1.987), y Brown y col. *Cancer Res.* 47:3577-3583 (1.987). Otras referencias describen CDR de roedor injertadas en una región de marco conservada (FR) de soporte humano antes de la fusión con un dominio constante apropiado de un anticuerpo humano. Véase, por ejemplo, Riechmann y col. *Nature* 332:323-327 (1.988), Verhoeven y col. *Science* 239:1534-1536 (1.988), y Jones y col. *Nature* 321:522-525 (1.986). Otra referencia describe CDR de roedor apoyada por regiones de marco conservadas (FR) revestidas recombinantemente. Véase, por ejemplo, Publicación de Patente Europea N° 0519596. Estas moléculas "humanizadas" se designan para minimizar respuestas inmunológicas no deseadas hacia las moléculas de anticuerpo de roedor antihumanas que limitan la duración y la eficacia de las aplicaciones terapéuticas de estos restos en receptores humanos. Por ejemplo, la región constante del anticuerpo se puede manipular de forma que sea inmunológicamente inerte (por ejemplo, no iniciando la destrucción por complemento). Véase, por ejemplo, el documento WO99/58572. Otros procedimientos para humanizar anticuerpos que también se pueden utilizar se desvelan por Daugherty y col., *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476 (1.991) y en Patente de Estados Unidos 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; y 6.350.861; y en la Publicación PCT N° WO 01/27160.

En otra alternativa más, se pueden obtener anticuerpos totalmente humanos utilizando ratones disponibles comercialmente que se han modificado para expresar proteínas inmunoglobulinas específicas humanas. Los animales transgénicos que se han diseñado para producir una respuesta inmune más deseable (por ejemplo, los anticuerpos totalmente humanos) o más robusta, también se pueden utilizar para la generación de anticuerpos humano o humanizados. Ejemplos de tal tecnología son Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ)

Como alternativa, los anticuerpos se pueden fabricar recombinantemente y expresar utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En otra alternativa, los anticuerpos se pueden fabricar recombinantemente por tecnología de selección de fagos. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N°s 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y 6.265.150; y Winter y col., *Ann. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1.994). Alternativamente, se puede utilizar la tecnología de selección de fagos (McCafferty y col., *Nature* 348:552-553 (1.990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de los repertorios genéticos de un dominio variable (V) de una inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio (V) variable están clonados en marco dentro de un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tales como el M13 o fd, y se seleccionan como fragmentos funcionales de anticuerpo sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de la cadena sencilla de ADN del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. El fago seleccionado puede presentarse en una variedad de formatos; como revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1.993). Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos génicos-V para la selección de fagos. Clackson y col., *Nature* 352:624-628 (1.991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de los genes V de donantes humanos sin inmunizar y se pueden aislar los anticuerpos para una matriz diversa de antígenos (incluyendo los autoantígenos) siguiendo las técnicas descritas por Mark y col., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1.991), o Griffith y col., *EMBO J.* 12:725-734 (1.993). En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones en una alta tasa (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una alta afinidad, y se replicarán y diferenciarán preferencialmente las células B que muestren inmunoglobulinas de superficie de alta afinidad durante el posterior desafío antigenico. Este proceso natural se puede imitar empleando la técnica conocida como "redistribución de cadena". Marks, y col., *Bio/Technol.* 10:779-783 (1.992)). En este procedimiento, la afinidad de los anticuerpos humanos "primarios" que se obtienen por selección de fagos se pueden mejorar por remplazo secuencial de los genes V de la región de cadena pesada y ligera con repertorios de variantes que se dan de manera natural (repertorios) del dominio de genes V obtenido de donantes sin inmunizar. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo pM-nM. Una estrategia para producir repertorios de anticuerpos por fagos muy largos (también conocido como "la madre de todas las bibliotecas") la ha descrito Waterhouse y col., *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266 (1.993). La redistribución genética también se puede utilizar para derivar los anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedores, en donde los anticuerpos humanos tienen afinidades similares y especificidades a los anticuerpos de roedores de los que parten. Según este procedimiento, que también se ha llamado "impronta de epítopos", los genes del dominio V de cadena pesada o ligera de los anticuerpos de roedor obtenidos por la técnica de selección de fagos se remplaza con un repertorio de genes del dominio V humano, que crean quimeras roedor-humanas. La selección del antígeno da lugar al aislamiento de regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio funcional de unión al antígeno, por ejemplo el epítopo que gobierna (imprenta) la elección de pareja. Cuando el proceso se repite con el fin de remplazar el dominio V del roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase, la Publicación PCT N°

WO93/06213, publicada el 1 de abril de 1.993). A diferencia de la humanización tradicional de los anticuerpos de roedor por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de armazón o de CDR de origen roedor.

- 5 Es aparente que aunque lo que se ha tratado anteriormente pertenece a los anticuerpos humanizados, los principios generales expuestos son aplicables para el uso de anticuerpos a medida, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Es aparente además que uno o más aspectos de humanizar un anticuerpo descritos en el presente documento se pueden combinar, por ejemplo, el injerto de CDR, la mutación del armazón y la mutación de CDR.
- 10 10 Los anticuerpos pueden producirse recombinantemente aislando primero los anticuerpos y las células productoras de anticuerpos de los animales hospedadores, obteniendo la secuencia genética, y utilizando la secuencia genética para expresar el anticuerpo recombinantemente en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro procedimiento que puede emplearse es expresar la secuencia de anticuerpos en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica.
- 15 15 Los procedimientos para expresar anticuerpos recombinantemente en plantas o leche se han desvelado. Véase por ejemplo Peeters, y col. Vaccine 19:2756 (2.001); Lonberg, N. y D. Huszar Int. Rev. Immunol 13:65 (1.995); y Pollock, y col., J Immunol Methods 231:147(1.999). Los procedimientos para fabricar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de cadena sencilla, etc. se conocen en la técnica.
- 20 20 También se pueden emplear inmunoensayos y citometría de flujo, técnicas de clasificación tales como la clasificación celular de fluorescencia activada (FACS), para aislar anticuerpos que son específicos para CGRP.
- 25 25 Los anticuerpos se pueden unir a varios vehículos diferentes. Los vehículos pueden ser activos y/o inertes. Ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen el polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, cristal, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser tanto soluble como insoluble, para los propósitos de la invención. Los expertos en la técnica sabrán de otros vehículos adecuados para su unión a anticuerpos, o serán capaces de asegurarla, utilizando la experimentación de rutina. En algunas realizaciones, el vehículo comprende un resto que reconoce el miocardio.
- 30 30 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando pruebas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez que se aísla, el ADN se debe colocar en vectores de expresión (tales como los vectores de expresión desvelados en la Publicación PCT Nº WO 87/04462), que entonces son 35 transfectados en las células hospedadoras tales como las células E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen por otra parte proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Véase por ejemplo la Publicación PCT Nº WO 87/04462. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes humanos de cadena pesada y ligera en lugar de las secuencias homólogas 40 murinas, Morrison y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851 (1.984), o por unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina en todo o en parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina. De esta manera se preparan anticuerpos "químéricos" o "híbridos" que tienen en el presente documento, especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-CGRP.
- 45 45 Los anticuerpos antagonistas anti-CGRP y los polipéptidos derivados de los anticuerpos se pueden identificar o caracterizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica, por los que se detecta y/o se mide la reducción, mejoría, o neutralización de la actividad biológica de un CGRP. Por ejemplo, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se puede identificar también incubando un agente candidato con CGRP y controlando cada una o más de las siguientes características: (a) que se une al CGRP; (b) que bloquee la unión del CGRP a su receptor(es); (c) que bloquee o 50 disminuya la activación del receptor CGRP (incluyendo la actividad del cAMP); (d) que inhiba la actividad biológica del CGRP o las rutas corriente abajo mediadas por la función de señalización del CGRP; (e) que prevenga, mejore, o trate cualquier aspecto del dolor de cabeza (por ejemplo, migraña); (f) que aumente el aclaramiento del CGRP; y (g) que inhiba (reduzca) la síntesis de CGR, su producción o liberación. En algunas realizaciones, se identifica un 55 anticuerpo antagonista anti-CGRP o un polipéptido incubando un agente candidato con CGRP y controlando la unión y/o la reducción o neutralización concomitantes de una actividad biológica del CGRP. El ensayo de unión se puede llevar a cabo con polipéptido(s) CGRP purificados, o con células que expresan naturalmente, o transfectadas para que expresen, polipéptido(s) CGRP. En una realización, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitivo, en el que se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un antagonista anti-CGRP por la unión con el CGRP. El ensayo se puede llevar a cabo en varios formatos, incluyendo el formato ELISA. En otras 60 realizaciones, un anticuerpo antagonista anti-CGRP se identifica incubando un agente candidato con CGRP y controlando la unión y la inhibición subsecuente de la activación del receptor CGRP expresado en la superficie de una célula.
- 65 65 A continuación de la identificación inicial, la actividad de un anticuerpo antagonista anti-CGRP candidato se puede confirmar más y afinar por bioensayos, conocidos para ensayar actividades biológicas definidas. De manera alternativa, los bioensayos se pueden utilizar para seleccionar candidatos directamente. Por ejemplo, el CGRP

- promueve varios cambios que son medibles en las células que responden. Estos incluyen, pero sin que se limiten a los mismos, estimulación del cAMP en la célula (por ejemplo, en células SK-N-MC). La actividad antagonista también se puede medir utilizando modelos animales, tales como la medición de la vasodilatación en la piel inducida por la estimulación del nervio safeno en la rata Escott y col., Br. J. Pharmacol. 110: 772-776, 1.993. Los modelos animales de dolores de cabeza (tales como, migraña) se pueden utilizar además para ensayar la eficacia de los anticuerpos antagonistas o los polipéptidos. Reuter, y col., Functional Neurology (15) Suppl.3, 2.000. Algunos de los procedimientos para identificar y caracterizar el anticuerpo antagonista anti-CGRP o el polipéptido se describen en detalle en los Ejemplos.
- 5 10 Los anticuerpos antagonistas anti-CGRP se pueden caracterizar utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento es identificar el epítopo al que se une, o "localización de epítopo". Hay muchos procedimientos conocidos en la técnica para localizar y caracterizar la localización de epítopos en las proteínas, incluyendo resolver la estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmentos genéticos, y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo en el Capítulo 11 de Harlow y Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1.999. En un ejemplo adicional, la localización de epítopo se puede utilizar para determinar la secuencia a la que un anticuerpo antagonista anti-CGRP se une. La localización de epítopos está disponible comercialmente en varias fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Bajos). El epítopo puede ser un epítopo lineal, por ejemplo, que está contenido en una única franja de aminoácidos, o un epítopo conformacional formado por la interacción tridimensional de aminoácidos que puede no estar contenida necesariamente en una única franja. Se pueden aislar péptidos de longitudes variadas (por ejemplo, al menos 4-6 aminoácidos de longitud) o sintetizarse (por ejemplo, recombinantemente) y utilizarse para ensayos de unión con un anticuerpo antagonista anti-CGRP. En otro ejemplo, el epítopo al que se une el anticuerpo antagonista anti-CGRP se puede determinar en barrido sistemático utilizando péptidos que se solapan derivados de la secuencia de CGRP y determinando la unión por el anticuerpo antagonista anti-CGRP. Según los ensayos de expresión de fragmentos génicos, el marco de lectura abierto que codifica el CGRP se fragmenta sea aleatoriamente o por construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de CGRP con el anticuerpo a ensayarse. Los fragmentos génicos pueden, por ejemplo, producirse por PCR y luego se transcriben y traducen en la proteína in vitro, en presencia de aminoácidos radioactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos CGRP marcados con radioactividad se determina entonces por inmunoprecipitación en electroforesis en gel. Ciertos epítopos se pueden identificar también utilizando grandes bibliotecas de secuencias peptídicas representadas en la superficie de las partículas de fagos (bibliotecas de fagos). De manera alternativa, una biblioteca definida de fragmentos peptídicos que se solapan puede ensayarse para que se unan al anticuerpo de ensayo en ensayos simples de unión. En un ejemplo adicional, se pueden llevar a cabo mutagénesis de un dominio de unión al antígeno, experimentos de intercambio de dominios y mutagénesis de exploración de alanina para identificar restos que se requieren, suficientes, y/o necesarios para la unión con el epítopo. Por ejemplo, los experimentos de intercambio de dominios se pueden llevar a cabo utilizando un CGRP mutante en el que varios fragmentos del polipéptido CGRP se han remplazado (intercambiado= con secuencias de una proteína íntimamente relacionada, pero antigenéticamente distinta (tal como otro miembro de la familia de las proteínas neurotropinas). Evaluando la unión del anticuerpo al CGRP mutante, se puede evaluar la importancia del fragmento CGRP en particular para la unión con el anticuerpo.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Otro método más que se puede utilizar para caracterizar un anticuerpo antagonista anti-CGRP es usar los ensayos de competición con otros anticuerpos que se sabe que se unen al mismo antígeno, es decir, varios fragmentos en el CGRP, para determinar si el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al mismo epítopo que otros anticuerpos. Los ensayos de competición los conocen los expertos en la técnica.
- Se puede utilizar un vector de expresión para dirigir la expresión de un anticuerpo antagonista anti-CGRP. Un experto en la técnica está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena in vivo. Véase, por ejemplo las Patentes de Estados Unidos N°s 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471. La administración de vectores de expresión incluye la administración sistémica o local, incluyendo la inyección, la administración vía oral, la pistola de partículas o la administración por catéter, y la administración tópica. En otra realización, el vector de expresión se administra directamente al tronco simpático o los ganglios, o en la arteria coronaria, aurícula, ventrículo o pericardio.
- También se puede utilizar el suministro dirigido de las composiciones terapéuticas que contienen un vector de expresión, o polinucleótidos subgenómicos. Las técnicas de suministro de ADN mediado por receptor se describen en, por ejemplo, Findeis y col., Trends Biotechnol. (1.993) 11:202; Chiou y col., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1.994); Wu y col., J. Biol. Chem. (1.988) 263:621; Wu y col., J. Biol. Chem. (1.994) 269:542; Zenke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU (1.990) 87:3655; Wu y col., J. Biol. Chem. (1.991) 266:338. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN por administración local en un protocolo de terapia génica. También se pueden utilizar intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 ng, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg, y aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos se pueden suministrar utilizando vehículos de suministro genético. El vehículo de

suministro genético puede ser de origen vírico o no vírico (véase de manera general, Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1.994) 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy* (1.994) 5:845; Connelly, *Human Gene Therapy* (1.995) 1:185; y Kaplitt, *Nature Genetics* (1.994) 6:148). La expresión de tales secuencias codificantes se puede inducir utilizando 5 promotores endógenos de mamífero o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede también ser o constitutiva o regulada.

Los vectores basados en virus para el suministro de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada 10 son bien conocidos en la técnica. Vehículos basados en virus ejemplares incluyen, pero sin limitación, retrovirus recombinantes (véase por ejemplo, Publicaciones PCT N°s WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; Patente de Estados Unidos N°s 5.219.740 and 4.777.127; Patente de GB N° 2.200.651; y Patente EP N° 0 345 242), vectores basados en alfavírus (por ejemplo, vectores víricos Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus Ross River (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus venezolano de la encefalitis equina (ATCC VR- 923; ATCC VR- 1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), y virus vectores asociados a adenovirus (AAV) (véase por ejemplo, Publicación PCT N°s WO 94/12649, WO 15 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11.984 y WO 95/00655). También se puede emplear la administración of ADN unido a adenovirus muertos como se describe en Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1.992) 3: 147.

Los vehículos y los procedimientos no víricos también se pueden emplear, incluyendo, pero sin limitarse a estos, 20 ADN poliacidónico condensado unido o no unido a adenovirus muertos solos (véase, por ejemplo, Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1.992)3:147); ADN unido a un ligando (véase, por ejemplo, Wu, *J. Biol. Chem.* (1.989) 264: 16985); células eucariotas de suministro celular (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.814.482; Publicaciones PCT N°s WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización de carga nucleica o fusión con membranas celulares. También se puede emplear el ADN desnudo. Los procedimientos ejemplares de introducción 25 de ADN desnudo se describen en la Publicación PCT N° WO 90/11092 y Patente de Estados Unidos N° 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de suministro de genes se describen en Patente de Estados Unidos N° 5.422.120; Publicaciones PCT N°s WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y EP 0524968. Se describen estrategias adicionales en Philip, *Mol. Cell Biol.* (1.994) 14: 2411, y en Woffendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1.994) 91: 1581.

30 C. Anticuerpo G1 y anticuerpos relacionados, polipéptidos, polinucleótidos, vectores y células hospedadoras

La invención puede usar composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden el anticuerpo G1 y sus variantes que se muestran en la Tabla 6 o polipéptidos derivados del anticuerpo G1 y sus variantes que se muestran en la Tabla 6; y polinucleótidos que comprenden las secuencias que codifican el G1 y sus variantes o polipéptidos. Como se utiliza en el presente documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos o polipéptidos (los cuales pueden ser o no anticuerpos) que se unen al CGRP, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más anticuerpos o polipéptidos que se unen al CGRP. Estas composiciones pueden además comprender excipientes adecuados, tales como los excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que son bien conocidos en la técnica.

40 Los anticuerpo antagonistas anti-CGRP usados con la invención se caracterizan por cualquiera (una o más) de las siguientes características: (a) se unen al CGRP; (b) bloquean la unión del CGRP a su receptor(es); (c) bloquea o disminuye la activación del receptor CGRP (incluyendo la activación del cAMP); (d) inhibe la actividad biológica o las rutas corriente abajo mediadas por la función de señalización del CGRP; (e) previene, mejora, o trata cualquier aspecto del dolor de cabeza (por ejemplo, migraña); (f) aumenta el aclaramiento del CGRP; y (g) inhibe (reduce) la síntesis, producción o liberación de CGRP.

En consecuencia, la divulgación proporciona cualquiera de lo siguiente, o composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de lo siguiente: (a) anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la 50 Tabla 6; (b) un fragmento de una región del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (c) una cadena ligera del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (d) una cadena pesada del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (e) uno o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (f) una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR) del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (g) la 55 CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo G1; (h) la CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (i) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (j) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (k) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada, del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; y (l) un anticuerpo que comprende cualquiera de (b) hasta (k). La invención también 60 proporciona polipéptidos que comprenden cualquiera o más de lo anterior.

Las porciones CDR del anticuerpo G1 (incluyendo las CDR Chothia y Kabat) se representan como un diagrama en la Figura 5. La determinación de las regiones CDR está bien en la experiencia de la técnica. Se entiende que en algunas realizaciones, las CDR pueden estar en una combinación de la CDR Kabat y la CDR Chothia (también denominadas "CDR combinadas" o "CDR extendidas"). En algunas realizaciones, las CDR son CDR Kabat. En otras realizaciones las CDR son CDR Chothia, una combinación de CDR, o combinaciones de las mismas.

- En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un polipéptido (que puede o no ser un anticuerpo) que comprende al menos una CDR, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis CDR que son sustancialmente idénticas a al menos una CDR, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis CDR del G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6. Otras realizaciones incluyen anticuerpos que tienen al menos dos, tres, cuatro, cinco, o seis CDR que son sustancialmente idénticas a al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR del G1 o derivado del G1. En algunas realizaciones, el al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR son al menos aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idénticas a al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR del G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6. Se entiende que, para los propósitos de esta invención, la especificidad de unión y/o la actividad total generalmente se retiene, aunque la extensión de la actividad puede variar al compararse con el G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6 (puede ser mayor o menor).
- La divulgación también proporciona un polipéptido (que puede ser o no un anticuerpo) que comprende una secuencia de aminoácidos del G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6 que tiene alguna de lo siguiente: al menos 5 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 8 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de una secuencia de G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6, en la que al menos 3 de los aminoácidos son de una región variable del G1 (Figura 5) o sus variantes que se muestran en la Tabla 6. En una realización, la región variable es de la cadena ligera del G2. En otra realización la región variable es de una cadena pesada del G1. Un polipéptido ejemplar tiene aminoácidos contiguos (de las longitudes descritas anteriormente) de ambas regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del G1. En otra realización, los 5 (o más) aminoácidos contiguos son de una región complementariamente determinante (CDR) de G1 que se muestra en la Figura 5. En algunas realizaciones, los aminoácidos contiguos son de una región variable del G1.
- La divulgación también proporciona procedimientos para fabricar estos anticuerpos o polipéptidos. Los anticuerpos de esta invención se pueden fabricar por procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos se pueden producir por proteolíticos u otros de degradación de los anticuerpos, por procedimientos recombinantes (es decir, polipéptidos únicos o de fusión) como se describió anteriormente o por síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente los polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se hacen convenientemente por síntesis química. Los procedimientos de síntesis química se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un anticuerpo podría producirse por un sintetizador automático de polipéptidos que emplea un procedimiento de fase sólida. Véase también Patentes de Estados Unidos N° 5.807.715; 4.816.567; y 6.331.415.
- En otra alternativa, los anticuerpos se pueden hacer recombinantemente utilizando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. En una realización, un polinucleótido comprende una secuencia que codifica las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo G1 que se muestran en la SEC. ID N°:9 y SEC. ID N°: 10. En otra realización, el polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC. ID N°: 9 y SEC. ID N°: 10 se clonian en uno o más vectores para su expresión o propagación. La secuencia codificante del anticuerpo de interés se puede mantener en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede entonces expandirse y congelarse para su uso en el futuro. Los vectores (incluyendo los vectores de expresión) y las células huésped se describen además en el presente documento.
- Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monocionales que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes, se pueden preparar utilizando los anticuerpos desvelados en el presente documento. Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Suresh y col., 1.986, *Methods in Enzymology* 121:210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos estaba basada en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, con las dos cadenas pesadas que tengan diferentes especificidades (Millstein y Cuello, 1.983, *Nature* 3055, 537-539).
- De acuerdo con una estrategia para fabricar anticuerpos biespecíficos, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación antígeno-anticuerpo) se fusionan a las secuencias de dominios constantes variables del anticuerpo. La fusión es preferentemente con el dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, regiones CH2 y CH3. Se prefiere que tenga la región constante de la primera cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN codifican las fusiones de cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se inserta en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad a la hora de ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en las realizaciones en las que las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos de las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no tienen una significación particular.

- En una estrategia, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera en solo una mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadena de inmunoglobulina que no se quieren. Esta estrategia se describe en la Publicación PCT N° WO 94/04690, publicada el 3 de marzo, 1.994.
- 5 Los anticuerpos heteroconjugados, comprenden los dos anticuerpos unidos covalentemente, están también en el ámbito de la invención. Tales anticuerpos se han usado para dirigir las células del sistema inmune a las células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (publicación de solicitud PCT N° WO 91/00360 y WO 92/200373; EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando los procedimientos de entrecruzamiento convenientes. Agentes de entrecruzamiento adecuados y las técnicas, se conocen bien en la técnica y están descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.
- 10 15 Los anticuerpos químéricos o híbridos también se pueden preparar in vitro utilizando procedimientos conocidos de química de síntesis proteica, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, la inmunotoxinas de pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o por formación de un puente tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptopbutirimidato.
- 20 25 El anticuerpo humanizado comprende una o más CDR del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6, o una o más CDR derivadas del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6 pueden hacerse utilizando cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal.
- 30 35 La invención engloba modificaciones del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6, incluyendo los anticuerpos funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente sus propiedades y las variantes que tienen aumentada o disminuida la actividad y/o la afinidad. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6 pueden mutarse para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión al CGRP deseada. La modificación de polipéptidos es de práctica rutinaria en la técnica y no necesita describirse en detalle en el presente documento. La modificación de polipéptidos se exemplifica en los Ejemplos. Ejemplos de polipéptidos modificados incluyen los polipéptidos con sustituciones conservadoras de restos de aminoácidos, una o más delecciones o adiciones de aminoácidos que no producen cambios significativamente perjudiciales en la actividad funcional, o el uso de análogos químicos.
- 40 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino y/o carboxilo variando en longitud desde un resto hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como las inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos únicos o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionil en el extremo N del anticuerpo fusionado a un epitopo marcado. Otras variantes insertadas de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión en el extremo N o C del anticuerpo con una enzima o un polipéptido que aumenta la vida media del anticuerpo en el suero.
- 45 50 Las variantes por sustitución tienen al menos un resto de aminoácido en el anticuerpo eliminado y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustituciones incluye las regiones hipervariables, pero las alteraciones de la FR también se contemplan. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones conservadoras". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, luego más cambios sustanciales, se denominan "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describen además más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, se pueden introducir y seleccionar los productos.

Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos

Resto original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	Val	Val; Leu; He
Arg (R)	Lys	Lys; Gin; Asn
Asn (N)	Gin	Gin; His; Asp, Lis; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gin (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gin

Resto original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones ejemplares
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gin; Lys; Arg
He (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	He	Norleucina; lie; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gin; Asn
Met(M)	Leu	Leu; Phe; lie
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; He; 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	He; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se alcanzan seleccionando las sustituciones que se diferencian significativamente en sus efectos de mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación laminar o helicoidal, (b) la carga de hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos que están naturalmente se dividen en dos grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) No-polar: Norleucina, Met, Ala, Val, Lau, He;
- (2) Polar sin carga: Cis, Ser, Ala, Val, Leu, He;
- (3) Ácida (cargada negativamente): Asp, Glu;
- (4) Básica (cargado positivamente): Lis, Arg;
- (5) Residuos que tienen influencia en la orientación de la cadena: Gli, Pro; y
- (6) Aromática: Trp, Tyr, Phe, His.

Las sustituciones no conservadoras se hacen por cambio de un miembro de estas clases por otra clase.

Cualquier resto de cisteína no está implicado en mantener la conformación apropiada del anticuerpo también se puede sustituir, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir el entrecruzamiento aberrante. A la inversa, las uniones de cisteína se pueden añadir al anticuerpo para mejorar su estabilidad, particularmente donde el anticuerpo es un fragmento Fv.

Las modificaciones de aminoácidos pueden variar desde el cambio o modificación de uno o más aminoácidos hasta el rediseño completo de una región, tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad de unión y/o la especificidad. En algunas realizaciones, no se hacen más de una a cinco modificaciones en un dominio CDR. En otras realizaciones, no se hacen más de una a tres sustituciones de aminoácidos conservadoras en un dominio CDR. En otras realizaciones más, el dominio CDR es CDR H3 y/o CDR L3.

Las modificaciones también incluyen los polipéptidos glucosilados y no glucosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones tradicionales, tales como, por ejemplo, la glicosilación con diferentes azúcares, acetilación, y fosforilación. Los anticuerpos están glucosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, 1.997, *Chem. Immunol.* 65: 111- 128; Wright y Morrison, 1.997, *TibTECH* 15: 26- 32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de las proteínas (Boyd y col., 1.996, *Mol. Immunol.* 32: 1311- 1318; Wittwe y Howard, 1.990, *Biochem.* 29: 4175- 4180) y la interacción intramolecular entre las

porciones de la glucoproteína que puede afectar la conformación y presentar la superficie tridimensional de la glucoproteína (Hefferis y Lund, supra; Wyss y Wagner, 1.996, *Current Opin. Biotech.* 7: 409- 416). Los oligosacáridos pueden servir también como diana en una glucoproteína determinada para ciertas moléculas que se basan en el reconocimiento específico de estructuras. La glicosilación de anticuerpos también se ha informado que afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, las células CHO con expresión

regulada por tetraciclina de la p (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc bisecada, fue informado que ha mejorado la actividad ADCC (Umana y col., 1.999, *Mature Biotech.* 17: 176-180).

La glicosilación de anticuerpos es típicamente tanto se une al N- u O-. Unido a N- se refiere a la fijación del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias del tripéptido asparagina-x-seirna, asparagina-x-treonina, y asparagina-x-cisteína, donde x es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la fijación enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de potencial glicosilación. La glicosilación unida O- se refiere a la fijación de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque la 5-hidroxiprolina o la 5-hidroxilisina también se pueden utilizar.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue convenientemente por alteración de la secuencia del aminoácido tal que contiene una o más de las secuencias tripéptídicas descritas anteriormente (para los sitios de glicosilación unida a N). La alteración se puede hacer por la adición de, o la sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glicosilación O).

El patrón de glicosilación de los anticuerpos también se puede alterar sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran medida de la célula huésped que se utiliza para expresar el anticuerpo. Aunque el tipo celular que se utiliza para la expresión de glucoproteínas recombinantes, por ejemplo anticuerpos, como terapéutica potencial raramente es la célula nativa, puede esperarse que haya variaciones en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo Hse y col., 1.997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070).

Además de la elección de las células huésped, los factores que afectan la glicosilación durante la producción de anticuerpos recombinantes incluyen el modo de crecimiento, la formulación de los medios, la densidad del cultivo, la oxigenación, el pH, los esquemas de purificación y similares. Se han propuesto varios procedimientos para alterar el patrón de glicosilación que se consigue en un organismo huésped en particular incluyendo la introducción y sobreexpresión de ciertas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (Patente de Estados Unidos N° 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glicosilación, o ciertos tipos de glicosilación, puede eliminarse enzimáticamente de la glucoproteína, por ejemplo utilizando la endoglucosidasa H (Endo H), N-glucosidasa F, endoglucosidasa F1, endoglucosidasa F2, endoglucosidasa F3. Además, la célula huésped recombinante se puede modificar genéticamente para ser defectuosa en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas y otras técnicas similares son bien conocidas en la técnica.

Otros procedimientos de modificación incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a estas, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Se pueden utilizar modificaciones, por ejemplo, para fijación de marcadores para inmunoensayos. Los polipéptidos modificados del G1 se fabrican utilizando procedimientos establecidos en la técnica y pueden seleccionarse utilizando ensayos de referencia conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen posteriormente y en los Ejemplos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte o parcialmente inerte, por ejemplo, no inicia la destrucción mediada por complemento, no estimula la toxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), o no activa la microglía; o tiene actividades reducidas (al compararse con el anticuerpo no modificado) en uno a más de lo siguiente: inicio de la destrucción mediada por el complemento, estímulo de la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), o activando la microglía. Las diferentes modificaciones de la región constante se pueden utilizar para alcanzar el nivel óptimo y/o la combinación de funciones efectoras. Véase, por ejemplo, Morgan y col., Immunology 86:319-324 (1.995); Lund y col., J. Immunology 157:4963-9 157:4963-4969 (1.996); Idusogie y col., J. Immunology 164: 4178-4184 (2.000); Tao y col., J. Immunology 143: 2595-2601 (1.989); y Jefferis y col., Immunological Reviews 163: 59-76 (1.998). En algunas realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1.999) 29: 2613-2624; Solicitud PCT N° PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de Patente del R.U N° 9809951.8. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante humana de cadena pesada que comprende las siguientes mutaciones A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia del tipo silvestre de IgG2). Eur. J. Immunol. (1.999) 29:2613-2624. En otras realizaciones más, la región constante está aglicosilada por glicosilación unida a N. En algunas realizaciones, la región constante está aglicosilada por glicosilación unida a M mutando el resto aminoácido glucosilado o flanqueando restos que son parte de la secuencia de reconocimiento de la glicosilación N en la región constante. Por ejemplo, el sitio de la glicosilación N puede estar mutado a A, Q, K o H. Véase, Tao y col., J. Immunology 143: 2595-2601 (1.989); y Jefferis y col., Immunological Reviews 163:59-76 (1.998). En algunas realizaciones la región constante está aglicosilada por glicosilación unida a N. La región constante puede estar aglicosilada por glicosilación unida a N enzimáticamente (tal como eliminando carbohidrato por la enzima PNGasa), o por expresión en una célula huésped deficiente en la glicosilación.

Otras modificaciones del anticuerpo incluyen los anticuerpos que se han modificado como se describe en la Publicación PCT N° WO 99/58572, publicado el 18 de noviembre, 1.999. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga en todo o en parte con un dominio constante de una cadena pesada de una inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unirse a una molécula diana sin iniciar una destrucción

- dependiente del complemento significativa, o la destrucción mediada por células de la diana. En algunas realizaciones, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. Estos se basan típicamente en dominios químéricos derivados de dos o más dominios C_h2 de cadenas pesadas de inmunoglobulinas humanas. Los anticuerpos modificados de esta manera son particularmente adecuados para su uso en terapias crónicas con anticuerpos, para prevenir reacciones inflamatorias y otras reacciones adversas a la terapia convencional con anticuerpos.
- 5 La invención incluye realizaciones de afinidad madura. Por ejemplo, los anticuerpos de afinidad maduros pueden producirse por procedimientos conocidos en la técnica (Marks y col., 1.992, Bio/ Technology, 10: 779- 783; Barbas y col., 1.994, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813; Schier y col., 1.995, Gene, 169: 147- 155; Yelton y col., 1.995, J. Immunol., 155: 1.994-2.004; Jackson y col., 1.995, J. Immunol., 154 (7): 3310- 9; Hawkins y col, 1.992, J. Mol. Biol., 226:889- 896; y documento WO 2.004/058184).
- 10 Se pueden utilizar los siguientes procedimientos para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Una forma de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (tal como mejorar) la afinidad de unión de un polipéptido, tal como un anticuerpo, se denomina "biblioteca de selección de mutagénesis". Generalmente, la biblioteca de selección de mutagénesis trabaja de la siguiente manera. Una o más posiciones de aminoácidos en la CDR se remplazan con dos o más (tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20) aminoácidos utilizando métodos reconocidos en la técnica. Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas 15 realizaciones, uno por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de dos o más miembros (si dos o más aminoácidos se sustituyen en cada posición). Generalmente la biblioteca también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo (no sustituido). Un pequeño número de clones, por ejemplo, aproximadamente 20-80 clones (dependiendo de la complejidad de la biblioteca), de cada librería se seleccionan 20 para la afinidad de unión con el polipéptido diana (u otra diana de unión), y se identifican los candidatos con un aumento, el mismo, un descenso, o que no se unen. Los procedimientos para determinar la afinidad de unión son 25 bien conocidos en la técnica. La afinidad de unión se puede determinar utilizando el análisis de resonancia de plasmiones de superficie Biacore, el cual detecta diferencias en la afinidad de unión de aproximadamente dos veces o mayor. El Biacore es particularmente útil cuando el anticuerpo de salida ya se une con una relativa alta afinidad, por ejemplo una K_D de aproximadamente 10 nM o más baja. La selección utilizando resonancia de plasmiones de 30 superficie Biacore se describe en los Ejemplos, en el presente documento.
- 35 La afinidad de unión se puede determinar utilizando el Biocensor Kinexa, ensayos de proximidad de centelleo, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), interrupción de fluorescencia, transferente de fluorescencia, y/o levadura de presentación. La afinidad de unión también se puede explorar utilizando un bioensayo adecuado.
- 35 En algunas realizaciones, cada posición de aminoácido en CDR se remplaza (en algunas realizaciones, una cada vez) con los 20 aminoácidos naturales utilizando procedimientos de mutagénesis reconocidos en la técnica (algunos de los cuales se describen en el presente documento). Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas realizaciones uno por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de 20 miembros 40 (si todos, los 20 aminoácidos, se sustituyen en cada posición).
- 45 En algunas realizaciones, la biblioteca a explorarse comprende sustituciones en dos o más posiciones, lo que puede estar en la misma CDR o en dos o más CDR. Por tanto, la biblioteca puede comprender sustituciones en dos o más posiciones en una CDR. La biblioteca puede comprender la sustitución en dos o más posiciones en dos o más CDR. La biblioteca puede comprender una sustitución en 3, 4, 5, o más posiciones, dichas posiciones se encuentran en dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR. La sustitución se puede preparar utilizando codones de baja redundancia. Véase por ejemplo, la Tabla 2 de Balint y col., (1.993) Gene 137 (1): 109-18).
- 50 La CDR puede ser CDRH2 y/o CDRL3. La CDR puede ser una o más de CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, y/o CDRH3. La CDR puede ser un CDR Kabat, una CDR Chothia, o una CDR extendida.
- 55 Los candidatos con unión mejorada se pueden secuenciar, y de esta manera identificar una sustitución mutante de CDR que dé lugar a afinidad aumentada (también denominada sustitución "aumentada"). Los candidatos que se unen pueden también secuenciarse, y de esta manera se identifica una sustitución de CDR que retiene la unión.
- 60 Se pueden llevar a cabo varias rondas de exploración. Por ejemplo, los candidatos (que comprenden cada uno una sustitución de un aminoácido en una o más posiciones de una o más CDR) con aumento de la unión también son útiles para el diseño de una segunda biblioteca que contenga al menos el aminoácido original y el aminoácido sustituido en cada posición mejorada de la CDR (es decir, la posición de aminoácidos en la CDR en la cual una sustitución mutante muestra unión mejorada). La preparación, y la exploración o selección de esta biblioteca se discute más adelante.
- 65 La biblioteca de selección de mutagénesis también proporciona un medio para caracterizar una CDR, en cuanto a que la frecuencia de los clones con unión mejorada, la misma unión, la unión disminuida o la no unión también proporciona información relativa a la importancia de cada posición de aminoácido para la estabilidad del complejo antígeno-anticuerpo. Por ejemplo si una posición de la CDR retiene la unión cuando se cambian los 20 aminoácidos,

esta posición se identifica con que es improbable que se requiera para la unión con el antígeno. Por el contrario, si la posición de la CDR retiene la unión solamente en un pequeño porcentaje de sustituciones, esa posición se identifica como que esa posición es importante para la función de la CDR. Por lo tanto, los procedimientos de exploración de la biblioteca de mutagénesis generan información con respecto a las posiciones en las CDR que pueden cambiarse con muchos aminoácidos diferentes (incluyendo todos, los 20 aminoácidos), y las posiciones en las CDR que no se pueden cambiar o las que solo pueden cambiarse en unos pocos aminoácidos.

5 Los candidatos con la afinidad aumentada se pueden combinar en una segunda biblioteca, que incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original en esa posición, y se puede además incluir sustituciones adicionales en esa posición dependiendo de la complejidad de la biblioteca que se deseé, o que se permita utilizando el procedimiento deseado de exploración y selección. Además, si se desea, la posición de los aminoácidos adyacentes se puede aleatorizar al menos para dos o más aminoácidos. La aleatorización de los aminoácidos adyacentes puede permitir una flexibilidad conformacional adicional en la CDR mutante, lo que puede a su vez, permitir o facilitar la introducción de un mayor número de mutaciones de mejora. La biblioteca también puede comprender sustituciones 10 en las posiciones que no mostraban aumento de la afinidad en la primera ronda de exploración.

15 La segunda biblioteca se explora o selecciona de los miembros de la biblioteca con afinidad de unión mejorada y/o alterada que utiliza cualquier procedimiento conocido en la técnica para la selección, incluyendo presentación de fagos, presentación de levaduras y presentación de ribosomas.

20 20 Un anticuerpo se puede unir a un agente marcador (alternativamente llamado "marca") tal como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Los marcadores son conocidos en la técnica que proporcionan generalmente (sea directa o indirectamente) una señal.

25 25 Dos secuencias de polinucleótido o polipéptido se dice que son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para la correspondencia máxima como se describe posteriormente. Las comparaciones entre las dos secuencias se realizan comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos 30 30 aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente 30 a aproximadamente 75, 40 a aproximadamente 50, en la que una secuencia se puede comparar con la secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean de manera óptima.

35 35 El alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación se puede llevar a cabo utilizando el programa Megalign en el paquete de software bioinformático de Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), utilizando los parámetros por defecto. Este programa da cuerpo a varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1.990, Unified Approach to Alignment and 40 Phylogenies pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1.989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and MullerW., 1.988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N, Nes, M, 1.987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., 1.983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

45 45 Preferentemente, el "porcentaje de identidad de la secuencia" se determina por comparación de las dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la porción de la secuencia del polinucleótido o polipéptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, normalmente del 5 al 15 por ciento, cuando se compara con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o delecciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que hay idénticas bases de ácido nucleico o restos aminoacídicos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de la secuencia.

55 55 Las variantes también pueden, o alternativamente, ser sustancialmente homólogas a un gen nativo, o a una porción o complemento de las mismas. Tales variantes de polinucleótido son capaces de hibridarse bajo condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia ADN que ocurre naturalmente que codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

60 60 Las "condiciones moderadamente rigurosas" incluyen el prelavado en una solución de SSC 5x, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 nM (pH 8,0); se hibridan a 50 °C-65 °C, en SSC 5x, una noche; después se lavan dos veces a 65 °C durante 20 minutos con SSC 2x, 0,5x y 0,2x que contiene SDS al 1%.

65 65 Como se utiliza en el presente documento, "condiciones altamente rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son

5 aquellas en las que: (1) se emplean poca fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/0,1% de sulfato dodecil sódico a 50 °C; (2) se emplea durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con seroalbúmina bovina al 0,1%/ Ficoll al 0,1%/ polivinilpirrolidona al 0,1%/ tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C; o (3) se emplea formamida al 50%, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, Solución Denhardt 5x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1%, y sulfato de dextrano al 10% a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2x (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55 °C, seguido por un lavado de alta rigurosidad que consiste en SSC 0,1x que contiene EDTA a 55 °C. El experto en la materia reconocerá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. como sea necesario para adecuar los factores tales como la longitud de la sonda y similares.

10 15 Se apreciará por los expertos habituales en la técnica que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como el que se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso del codón se contemplan específicamente en la presente invención. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento están en el ámbito de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que están alterados como consecuencia de una o más mutaciones, tales como delecciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm resultante y la proteína pueden, pero no necesariamente, tener una estructura o una función alteradas. Los alelos se pueden identificar utilizando técnicas de referencia (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencia de la base de datos).

20 25 Los polinucleótidos se pueden obtener utilizando la síntesis química, los procedimientos recombinantes, o la PCR. Los procedimientos de síntesis química de polinucleótidos se conocen bien en la técnica y no necesitan describirse en detalle en el presente documento. Un experto en la técnica puede utilizar las secuencias proporcionadas en este documento y un sintetizador comercial de ADN para producir una secuencia de ADN deseada.

30 35 Para preparar polinucleótidos utilizando procedimientos recombinantes, un polinucleótido que comprende una secuencia deseada se puede insertar en un vector adecuado, y el vector a su vez se puede introducir en una célula huésped adecuada para su replicación y amplificación, como además se trata en el presente documento. Los polinucleótidos se pueden insertar en células huésped por cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman introduciendo el polinucleótido exógeno por toma directa, endocitosis, transfección, acoplamiento-F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno puede mantenerse en las células como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrado en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido así amplificado se puede aislar de la célula huésped por procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., (1.989).

40 De manera alternativa, la PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología PCR se conoce bien en la técnica y se describe en las Patentes de Estados Unidos N°s 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202, así como en PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis y col. eds., Birkhäuser Press, Boston (1.994).

45 El ARN se puede obtener utilizando el ADN aislado en un vector apropiado e insertándolo en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN, el ARN se puede entonces aislar utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, como se expone en Sambrook y col., (1.989), por ejemplo.

50 55 Se pueden construir vectores de clonaje adecuados según las técnicas de referencia, o se pueden seleccionar de un gran número de vectores de clonaje disponibles en la técnica. Aunque el vector de clonaje seleccionado puede variar según la célula huésped que se pretenda utilizar, los vectores de clonaje útiles generalmente tendrán la capacidad de auto-replicarse, pueden poseer una única diana por una particular endonucleasa de restricción, y/o pueden llevar genes para un marcador que se puede utilizar en seleccionar los clones que contienen el vector. Ejemplos adecuados incluyen los plásmidos y los virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBSSK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN fago, y vectores lanzadera tales como pSA3 and pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonaje están disponibles en los vendedores comerciales tales como BioRad, Strategene, e Invitrogen.

60 65 Los vectores de expresión generalmente son construcciones de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido. Esto implica que un vector de expresión debe ser replicable en las células hospedadoras sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen aunque no se limitan a estos, plásmidos, vectores víricos, incluyendo adenovirus, virus adeno-associados, retrovirus, cósmidos, y vectores de expresión desvelados en la Publicación PCT N° WO 87/04462. Los componentes de los vectores pueden incluir generalmente, pero no se limitan a estos, uno o más de lo siguiente: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores; elementos adecuados de control de la transcripción (tales como promotores, aumentadores y terminador). Para la expresión (es decir, traducción), se requieren uno o más elementos que controlen la traducción, tal como sitios de unión al ribosoma, sitios de inicio de la traducción, y codones de parada.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés se pueden introducir en una célula huésped por cualquiera de varios medios apropiados, incluyendo electroporación, transfección empleando cloruro cálcico, cloruro rubídico, fosfato cálcico, dextrano-DEAE, u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, donde el vector es un agente infeccioso tal como un virus vacunal). La elección de los vectores introductores de polinucleótidos dependerá a menudo de las características de la célula huésped.

La divulgación también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento. Cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogos se puede utilizar con el fin de aír los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Ejemplos sin limitación de células huésped de mamífero incluyen pero sin limitarse a estas, COS, HeLa, y células CHO. Véase también la Publicación PCT Nº WO 87/04462. Células huésped no mamíferas adecuadas incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levaduras (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). Preferentemente, las células huésped expresan los ADNc a un nivel de aproximadamente 5 veces más alto, más preferentemente 10 veces más altos, incluso más preferentemente 20 veces más alto que el correspondiente al anticuerpo endógeno o proteína de interés, se está presente, en las células huésped. Se puede identificar una célula que sobreexpresa el anticuerpo o la proteína de interés.

D. Composiciones

Las composiciones utilizadas en la invención comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-CGRP descrito en el presente documento. Ejemplos de tales composiciones, así de cómo se formulan, están también descritos en la sección anterior y posteriormente. En una realización, la composición comprende además un antagonista CGRP. En otra realización la composición comprende uno o más anticuerpos antagonistas anti-CGRP. En otras realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP reconoce el CGRP humano. En otras realizaciones más, el anticuerpo antagonista anti-CGRP está humanizado. En otra realización más, al anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende una región constante que no inicia una respuesta inmune no buscada ni deseada, tal como la destrucción mediada por anticuerpo o ADCC. En otras realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende una o más CDR del anticuerpo G1 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o en algunas realizaciones, todas las seis CDR del G1). En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP es humano.

Se entiende que las composiciones pueden comprender más de un anticuerpo antagonista anti-CGRP (por ejemplo, una mezcla de anticuerpos antagonistas anti-CGRP que reconocen diferentes epítopos del CGRP). Otras composiciones exemplares comprenden más de un anticuerpo antagonista anti-CGRP que reconocen el mismo epítopo, o diferentes especies de anticuerpos antagonistas anti-CGRP que se unen a diferentes epítopos del CGRP.

La composición utilizada en la presente invención puede además comprender vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizadores (Remington: The Science and practice of Pharmacy 20th Ed. (2.000) Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover.), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos aceptables, excipientes o estabilizadores no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones, y pueden comprender tampones tales como de fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como el cloruro de octadecilmethylbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tal como el metil o el propilparabeno; catacol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como la seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como la polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, manosa, o dextranos; agentes quelantes tales como el EDTA; azúcares tales como la sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol, iones que intervienen en la formación de sales tales como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteínas; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™ o polietilenglicol (PEG). Más excipientes aceptables farmacéuticamente se describen en el presente documento.

El anticuerpo antagonista anti-CGRP y las composiciones de los mismos también se pueden utilizar en conjunción con otros atentos que sirvan para aumentar o complementar la efectividad de los agentes.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar pero no limitan la invención

Ejemplos

60 Ejemplo 1: Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra CGRP

Generación de anticuerpos anti-CGRP. Para generar anticuerpos anti-CGRP que tengan reactividad cruzada entre especies, para CGRP de rata y humano, se inmunizaron ratones con 25-100 μ l de α -CGRP humano o β -CGRP conjugado con KLH en adyuvante (50 μ l para las plantas de los pies, 100 μ l totales por ratón) a varios intervalos. La inmunización generalmente se llevó a cabo como se describe en Geerligs HJ y col., 1.989, J. Immunol. Methods 124: 95-102; Kenney JS y col., 1.989, J. Immunol. Methods 121:157-166; y Wicher K y col., 1.989, Int. Arch. Allergy Appl.

- Immunol. 89:128-135. Los ratones primero se inmunicaron con 50 µg de α -CGRP o β -CGRP humanos conjugado con KLH en CFA (adyuvante completo de Freund). Después de 21 díá, los ratones se inmunicaron secundariamente con 25 µg de β -CGRP humano (por cada ratón que se había inmunicado primero con α -CGRP) o α -CGRP (para los ratones que primeros se inmunicaron con β -CGRP) conjugado con KLH en IFA (adyuvante incompleto de Freund).
- 5 Veintitrés díá después de la segunda inmunicación, se llevó a cabo una tercera inmunicación con 25 µg de α -CGRP de rata conjugada con KLH en IFA. Diez díá más tarde, se ensayaron los títulos de anticuerpo utilizando ELISA. Se llevó a cabo una cuarta inmunicación con 25 µg del péptido (α -CGRP de rata en KLH) en IFA 34 díá después de la tercera inmunicación. Se llevó a cabo un refuerzo con 100 µg de péptido soluble (α -CGRP de rata) 32 díá después de la cuarta inmunicación.
- 10 10 Se obtuvieron los esplenocitos de los ratones inmunicados y se fusionaron con células de mieloma NSO en una relación de 10:1, con polietilenglicol 1500. Los híbridos se pusieron en placas de 96 pocillos en DMEM que contenía un 20% de suero de caballo y 2-oxaloacetato/piruvato/insulina (Sigma), y comenzó la selección en hipoxantina/aminopterina/timidina. El díá 8, 100 µl de DMEM que contenía el 20% de suero de caballo se añadieron a todos los pocillos. Los sobrenadantes de los híbridos se seleccionaron utilizando el inmunoensayo de captura de anticuerpos. La determinación de la clase del anticuerpo se hizo con un segundo anticuerpo específico de clase.
- 15 15 Se seleccionó un panel de líneas celulares productoras de anticuerpo monoclonal basándose en su unión al CGRP humano y de rata para su posterior caracterización. Estos anticuerpos y características se muestran posteriormente en las Tablas 2 y 3.
- 20 20 Se seleccionó un panel de líneas celulares productoras de anticuerpo monoclonal basándose en su unión al CGRP humano y de rata para su posterior caracterización. Estos anticuerpos y características se muestran posteriormente en las Tablas 2 y 3.
- 25 25 Purificación y preparación de fragmentos Fab. Los anticuerpos monoclonales seleccionados para su posterior caracterización se purificaron de los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma utilizando la cromatografía de afinidad a la proteína A. Los sobrenadantes se equilibraron a pH 8. Los sobrenadantes se cargaron entonces en la columna de proteína A MabSelect (Amersham Biosciences nº 17-5199-02) se equilibraron con PBS a pH 8. Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de PBS, pH 8. Los anticuerpos se eluyeron con tampón citrato-fosfato 50 mM, pH 3. Los anticuerpos eluídos se neutralizaron con tampón fosfato 1 M, pH 8. Los anticuerpos purificados se dializaron entonces con PBS, pH 7,4. Las concentraciones de anticuerpo se determinaron por SDS-PAGE, utilizando una curva de referencia de anticuerpos monoclonales murinos.
- 30 30 Se prepararon los Fab por proteólisis en papaína de los anticuerpos completos utilizando el kit Inmunopure Fab (Pierce nº 44885) y se purificaron por flujo a través de cromatografía de proteína A siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones se determinaron por ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE utilizando una referencia Fab de concentración conocida (determinada por análisis de aminoácidos), y por A280 utilizando 10D=0,6 mg/ml (o el equivalente teórico basándose en la secuencia de aminoácidos).
- 35 35 Determinación de la afinidad de los Fab. Las afinidades de los anticuerpos monoclonales anti-CGRP se determinaron a 25 °C o 37 °C utilizando el sistema de resonancia de plasmones de superficie (SPR) Biacore3000™ (Biacore, INC, Piscataway NJ) con el tampón de trabajo propio del fabricante, HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Polisorbato P20 al 0,005% v/v). Se determinó la afinidad capturando los péptidos CGRP biotinilados N-terminalmente (pedidos a medida en Gen-Script Corporation, New Jersey o Global Peptide Services, Colorado) por medio de estreptavidina on chip SA y midiendo las cinéticas de unión del Fab del anticuerpo titulado a lo largo de la superficie del CGRP. Se diluyó el CGRP biotinilado en HBS-EP y se inyectó en el chip a una concentración de menos de 0,001 mg/ml. Se alcanzaron dos intervalos de densidad del antígeno utilizando un flujo de tiempo variable a lo largo de los canales individuales del chip: <50 unidades de respuesta (RU) para estudios cinéticos detallados y aproximadamente 800 RU para estudios de concentración y selección. Se inyectaron diluciones seriadas de dos o tres veces que dan concentraciones típicamente oscilando entre 1 µM – 0,1 mM (con un objetivo de 0,1-10x la K_D estimada) de fragmentos purificados Fab que se inyectaron durante un minuto a 100 µl/min y se permitieron tiempos de disociación de 10 minutos. Después de cada ciclo de unión, se regeneraron las superficies con NaOH 25 mM en etanol al 25% v/v, que fue tolerado unos cientos de ciclos. Se obtuvieron la constante cinética de asociación (k_{on}) y la constante de disociación (k_{off}) ajustando los datos a 1:1 modelo de unión de Langmuir (Karlsson, R. Roos, H.Fagerstam, L. Petersson, B. (1.994). Methods Enzymology 6.99-110) utilizando el programa de BIAevaluación. El equilibrio global de las constantes de disociación (K_D) o "afinidades" se calcularon de la relación $K_D = k_{off}/k_{on}$. Las afinidades de los fragmentos Fab murinos se muestran en las Tablas 2 y 3.
- 40 40 55 Localización del epítopo de los anticuerpos anti-CGRP murinos. Para determinar el epítopo al que los anticuerpos anti-CGRP se unen al α -CGRP humano, se midieron las afinidades de los fragmentos Fab a varios fragmentos CGRP como se describió anteriormente capturando los aminoácidos 19-37 y los aminoácidos 25-37 de los fragmentos CGRP biotinilados N-terminalmente sobre un chip sensor. La Figura 1 muestra sus afinidades de unión medidas a 25 °C. Como se muestra en la Figura 1, todos los anticuerpos, excepto el anticuerpo 4901, se unen a los fragmentos α -CGRP humanos 19-37 y 25-37 con afinidad similar a su afinidad de unión a la longitud total del fragmento α -CGRP humano, debido principalmente a pérdida de velocidad de disociación. Los datos indican que estos anticuerpos anti-CGRP generalmente se unen al extremo terminal C del CGRP.
- 45 45 60 60 65 65 La selección de alanina se llevó a cabo para caracterizar más los aminoácidos en el α -CGRP humano implicado en

la unión a los anticuerpos anti-CGRP. Se generaron variantes diferentes del α -CGRP humano con sustituciones sencillas de alanina por síntesis peptídica. Sus secuencias de aminoácidos se muestran en la Tabla 4 junto con todos los otros péptidos utilizados en el análisis Biacore. Las afinidades de los fragmentos Fab de los anticuerpos anti-CGRP a estas variantes se determinaron utilizando Biacore como se describió anteriormente. Como se muestra en la Figura 1, todos los 12 anticuerpos se enfocaron un epítopo C-terminal, siendo el aminoácido F37 el resto más crucial. La mutación del F37 a alanina disminuyó significativamente la afinidad o incluso perdió completamente la unión de los anticuerpos anti-CGRP al péptido. El siguiente resto de aminoácido más importante es el G33, sin embargo, solamente los anticuerpos de alta afinidad (7E9, 8B6, 10 A8, y 7D11) se afectaron por el remplazo de alanina en esta posición. El resto de aminoácido S34 también tiene un papel significativo, pero menor, en la unión de estos cuatro anticuerpos de alta afinidad.

Tabla 2. Características de la unión de los anticuerpos monoclonales anti-CGRP al α -CGRP humano y su actividad antagonista

Anticuerpos	K_D para α -CGRP humano a 25 °C (nM)	K_D para α -CGRP humano a 37 °C (nM)	Bloqueo basado en células de la unión del α -CGRP humano a su receptor a 25°C (medido por activación del cAMP)	IC_{50} (nM sitios de unión) a 25°C (temp. amb.) medido en el ensayo de unión por radioligandos.
7E9	1,0	0,9	Sí	2,5
8B6	1,1	1,2	Sí	4,0
10A8	2,1	3,0	Sí	n.d.
7D11	4,4	5,4	Sí	n.d.
6H2	9,3	42	Sí	12,9
4901	61	139	Sí	58
14E10	80	179	Sí	n.d.
9B8	85	183	Sí	n.d.
13C2	94	379	No	n.d.
14A9	148	581	No	n.d.
6D5	210	647	No	n.d.
1C5	296	652	No	n.d.

Nota: El anticuerpo 4901 está disponible comercialmente (Sigma, Producto N° C7113).
n.d. = no determinado

Tabla 3. Características de la unión de los anticuerpos monoclonales anti-CGRP al α -CGRP de rata y su actividad

Anticuerpos	K_D para α -CGRP de rata a 37°C (nM)	Bloqueo basado en células de la unión del α -CGRP de rata a su receptor a 25°C (medido por la activación del cAMP)	Bloqueo in vivo en el ensayo del nervio safeno
4901	3,4	Sí	Sí
7E9	47	Sí	Sí
6H2	54	No	No
8B6	75	Sí	Sí
7D11	218	Sí	Sí
10A8	451	No	n.d.
9B8	876	No	n.d.
14E10	922	No	n.d.
13C2	> 1000	No	n.d.
14A9	> 1000	No	n.d.
6D5	> 1000	No	n.d.
1C5	> 1000	No	n.d.

“n.d.” indica que no se llevó a cabo el ensayo para ese anticuerpo.

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de los fragmentos α -CGRP humanos (SEC. ID N°s: 15-40) y péptidos relacionados (SEC. ID N°s: 41-47). Todos los péptidos están amidados C-terminalmente excepto las SEC ID. N°s: 36-40. Los restos en negrita indican punto de mutaciones

CGRP	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
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)	SGGVVKNNFVPTNVGSMAF	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
α de rata (1-37)	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKDNFVPTNVGSEAF	41
α de rata (19-37)	SGGVVKDNFVPTNVGSEAF	42
β humano (1-37)	ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKSNFVPTNVGSKAF	43
Calcitonina Humana (1-32)	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	45
Amilina Humana (1-37)	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	46
Adrenomedulina Humana (1-52)	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDK DKDNVAPRSKISPQGY	47

Ejemplo 2: Selección de anticuerpos antagonistas anti-CGRP utilizando ensayos in vitro.

- 5 Los anticuerpos anti-CGRP murinos fueron seleccionados según su actividad antagonista in vitro utilizando el ensayo basado en células de activación del cAMP y el ensayo de unión.

Actividad antagonista medida por el ensayo cAMP. Se dispensaron cinco microlitros de α -CGRP humano o de rata (a una concentración final de 50 nM) en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-CGRP (a una concentración final de 1 – 3000 nM), o un α -CGRP de rata o un α -CGRP humano (a una concentración final de 0,1 nM – 10 μ M; como control positivo para la activación d c-AMP) en una placa de 384 pocillos (Nunc, N° Cat. 264657). Se añadieron diez microlitros de células (si se utilizaba α -CGRP humano células SK-N-MC humanas, o si se utilizaba α -CGRP de rata L6 de rata del ATCC) en tampón de estimulación (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 146 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX)) en los pocillos de la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Después de la incubación, se llevó a cabo la activación del cAMP utilizando el ensayo de Complementación de Fragmentos Enzimáticos HitHunterTM (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo se basa en una enzima β -galactosidasa manipulada genéticamente que consisten en dos fragmentos denominados Aceptor enzimático (AE) y Donante enzimático (DE). Cuando los dos fragmentos están separados, la enzima está inactiva. Cuando los fragmentos están juntos se pueden recombinar espontáneamente para formar la enzima activa por un proceso llamado complementación. La plataforma para el ensayo EFC utiliza un péptido DE-cAMP conjugado en el que el cAMP se reconoce por un anti-cAMP. Este fragmento DE es capaz de reasociarse con el AE para formar la enzima activa. En el ensayo, el anticuerpo anti-cAMP está titulado óptimamente para unirse al conjugado DE-cAMP e inhibir la formación de la enzima. Los niveles de cAMP en las muestras de lisado celular compiten con el

conjugado DE-cAMP para unirse al anticuerpo anti-cAMP. La cantidad de conjugado DE libre en el ensayo es proporcional a la concentración de cAMP. Por tanto, el cAMP se mide por la formación de enzima activa que se cuantifica por la renovación del sustrato luminiscente de la p-galactosidasa. El ensayo de activación del cAMP se llevó a cabo añadiendo 10 μ l de tampón de lisis y anticuerpo anti-cAMP (relación 1:1) seguido por incubación a 5 temperatura ambiente durante 60 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadieron 10 μ l de reactivo DE-cAMP en cada pocillo y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se añadieron 20 μ l de reactivo AE y mezcla CL (que contenía el sustrato) (relación 1:1) en cada pocillo y se incubó durante 1-3 horas o toda la noche a temperatura ambiente. La placa se leyó a 1 segundo/pocillo en un instrumento PMT o a 30 segundos/placa en una cámara. Los anticuerpos que inhibían la activación de cAMP por el α -CGRP se identificaron 10 (representados como "Sí") en las Tablas 2 y 3 anteriores. Los datos en las Tablas 2 y 3 indican que los anticuerpos que demostraron actividad antagonista en el ensayo generalmente tienen alta afinidad. Por ejemplo, los anticuerpos que tienen una K_D (determinada a 25 °C) de aproximadamente 80 nM o menos para el α -CGRP humano o que tienen una K_D (determinada a 37 °C) de aproximadamente 47 nM o menos para un α -CGRP de rata muestran actividad en este ensayo.

15 Ensayo de unión por radioligando. El ensayo de unión se llevó a cabo para medir la Cl_{50} del anticuerpo anti-CGRP en el bloqueo del CGRP de la unión al receptor como se describió anteriormente. Zimmermann y col., Peptides 16: 421-4, 1.995; Mallee y col., J. Biol. Chem. 277: 14294-8, 2.002. Se incubaron membranas (25 μ g) de células SK-N-MC durante 90 minutos a temperatura ambiente en un tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, 20 BSA al 0,1%) que contenía 10 pM de α -CGRP ¹²⁵I humano en un volumen total de 1 ml. Para determinar las concentraciones de inhibición (Cl_{50}) los anticuerpos o el CGRP sin marcar (como un control), desde una solución 100 veces más alta que la solución madre se disolvieron a concentraciones variables en el tampón de incubación y se incubaron al mismo tiempo con las membranas y 10 pM de α -CGRP ¹²⁵I humano. Se terminó la incubación por filtración a través de un filtro de microfibra de cristal (GF/B, Vm) que había sido bloqueado con polietilenimina al 0,5%. Se dibujaron las curvas de respuesta a las dosis y K ; se determinaron los valores utilizando la ecuación: $Ki=Cl_{50}/(1+([ligando]/K_D))$; donde la constante de equilibrio de disociación K_D = 8 pM para el α -CGRP para el receptor CGRP1 presente en las células SK-N-MC, y $B_{máx}$ = 0,025 pmol/mg de proteína. El valor informado de Cl_{50} (en términos de moléculas IgG) se convirtió a los sitios de unión (multiplicándolo por 2) de forma que se pudo comparar 25 con las afinidades (K_D) determinadas por Biacore (véase la Tabla 2).

30 La Tabla 2 muestra la Cl_{50} de los anticuerpos murinos 7E9, 8B6, 6H2 y 4901. Los datos indican que la afinidad de los anticuerpos generalmente se correlaciona con la Cl_{50} : los anticuerpos con mayor afinidad (valores de K_D más bajos) tienen una Cl_{50} más baja en el ensayo de unión con radioligando.

35 Ejemplo 3: Efecto de los anticuerpos antagonistas anti-CGRP sobre la vasodilatación de la piel inducida por la estimulación del nervio safeno en la rata

40 Para ensayar la actividad antagonista de anticuerpos anti-CGRP, se ensayó el efecto de los anticuerpos sobre la vasodilatación de la piel por estimulación del nervio safeno de la rata utilizando un modelo de rata descrito anteriormente. Escott y col., Br. J. Pharmacol. 110:772-776, 1.993. En este modelo de rata, la estimulación eléctrica del nervio safeno induce la liberación de CGRP desde las terminaciones nerviosas. Dando como resultado un incremento en el flujo sanguíneo de la piel. Se midió el flujo sanguíneo en la piel del pie del macho de rata Sprague-Dawley (170-300 g, de Charles River Hollister) después de la estimulación del nervio safeno. Las ratas se mantuvieron bajo anestesia con isofluorano al 2%. Se les dio al principio del experimento tosilato de bretilio para 45 minimizar la vasoconstricción debida a la estimulación concomitante de las fibras simpáticas del nervio safeno. La temperatura corporal se mantuvo a 37 °C utilizando una sonda rectal conectada con un termostato a una manta eléctrica controlada por temperatura. Los compuestos, incluyendo los anticuerpos, los controles positivos (CGRP 8-37), y el vehículo (PBS, Tween 20 al 0,01%) se aplicaron por vía intravenosa a través de la vena femoral derecha, excepto para el experimento que se muestra en la Figura 3, en el que el compuesto de ensayo y el control se 50 inyectaron en la vena de la cola, y para los experimentos mostrados en las Figuras 2A y 2B, los anticuerpos 4901 y 7D11 se inyectaron por vía intraperitoneal (ip). El compuesto control positivo CGRP 8-37 (antagonista de vasodilatación), debido a su corta vida media, se administró 3-5 minutos antes de la estimulación nerviosa a 400 nmol/kg (200 μ l). Tan y col., Clin. Sci. 89:656-73, 1.995. Los anticuerpos se dieron en distintas dosis (1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, y 25 mg/kg).

55 Para los experimentos mostrados en las Figuras 2 A y 2B, se administraron el anticuerpo 4901 (25 mg/ml), el anticuerpo 7D11 (25 mg/kg), o el control con el vehículo (PBS con Tween 20 al 0,01%) por vía intraperitoneal (ip) 72 horas antes de la estimulación por pulsos eléctricos. Para el experimento mostrado en la Figura 3, se administraron el anticuerpo 4901 (1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, y 25 mg/kg) o el vehículo control (PBS con Tween 20 al 0,01%) por vía intravenosa 24 horas antes de la estimulación por pulsos eléctricos. Después de la administración de 60 los anticuerpos o del vehículo control, el nervio safeno de la pata derecha se expuso quirúrgicamente, se cortó proximalmente y se cubrió con una tira de plástico para prevenir la desecación. Una sonde Doppler láser se colocó en el lado medio-dorsal de la piel de la garra trasera, que es la región que inerva el nervio safeno. El flujo sanguíneo cutáneo, medido como flujo celular sanguíneo, se controló con un medidor Doppler láser. Cuando se estableció una línea base estable (menos del 5% de variación) durante al menos 5 min, se colocó el nervio sobre unos electrodos 65

de aluminio bipolar y se estimuló eléctricamente con 60 pulsos (2 Hz, 10 V, 1ms, durante 20 seg) y luego otra vez 20 minutos más tarde. El cambio acumulativo en el flujo sanguíneo cutáneo se estimó por el área bajo la curva de flujo-tiempo (AUC, que es igual al cambio en el flujo multiplicado por el cambio en el tiempo) para cada respuesta de flujo a la estimulación por pulsos eléctricos. Se tomó el promedio de la respuesta al flujo sanguíneo de dos estimulaciones. Los animales se mantuvieron bajo anestesia por un periodo de una a tres horas.

Como se muestra en la Figura 2 A y en la Figura 2B, el incremento de flujo sanguíneo estimulado por la aplicación de unos pulsos eléctricos sobre el nervio safeno, se inhibió en presencia del CGRP 8-37 (400 nmol/kg, administrado i.v.), el anticuerpo 4901 (25 mg/kg, administrado ip), o el anticuerpo 7D11 (25 mg/kg administrado ip) cuando se compara con el control. El CGRP 8-37 se administró 3-5 minutos antes de la estimulación del nervio safeno; y los anticuerpos se administraron 72 horas antes de la estimulación del nervio safeno. Como se muestra en la Figura 3, el aumento del flujo sanguíneo estimulado por la aplicación de pulsos electrónicos sobre el nervio safeno fue inhibido en presencia del anticuerpo 4901 a diferentes dosis (1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, y 25 mg/kg) administradas por vía intravenosa 24 horas antes de la estimulación del nervio safeno.

Para los experimentos mostrados en las Figuras 4 A y 4B, se expuso el nervio safeno quirúrgicamente antes de la administración de los anticuerpos. El nervio safeno de la pata derecha se expuso quirúrgicamente, se cortó proximalmente y se cubrió con envoltura plástica para prevenir la desecación. Se colocó una sonda Doppler láser en el lado medio-dorsal de la piel de la garra trasera que es la región inervada por el nervio safeno. Se controló el flujo sanguíneo cutáneo, medido como flujo celular sanguíneo, con un medidor de flujo Doppler láser. De treinta a cuarenta y cinco minutos después de la inyección de tosilato de bretilio, cuando se estableció una línea base estable de flujo (una variación menor del 5%) durante al menos 5 min, se colocó el nervio sobre electrodos de platino bipolar y se estimuló eléctricamente (2 Hz, 10 V, 1 ms, durante 30 seg) y de nuevo 20 minutos más tarde. El promedio de la respuesta de flujo sanguíneo a estas dos estimulaciones se utilizó para establecer la respuesta de línea base (tiempo 0) a la estimulación eléctrica. Se administraron entonces por vía intravenosa (i.v.), el anticuerpo 4901 (1 mg/kg o 19 mg/kg), el anticuerpo 7E9 (10 mg/kg), el anticuerpo 8B6 (10 mg/kg), o el vehículo (PBS con Tween 20 al 0,01%). El nervio se estimuló posteriormente (2 Hz, 10 V, 1ms, durante 30 seg) a los 30 minutos, 60 min, 90 min, y 120 min después de la administración del anticuerpo o el vehículo. Los animales se mantuvieron bajo anestesia durante un periodo de aproximadamente tres horas. El cambio acumulado en el flujo sanguíneo se estimó por el área bajo la curva flujo-tiempo (AUC, que es igual al cambio en el flujo multiplicado por el cambio en el tiempo) para cada respuesta de flujo a las estimulaciones por pulsos eléctricos.

Como se muestra en la Figura 4A, el incremento de flujo sanguíneo estimulado por la aplicación de pulsos electrónicos sobre el nervio safeno se inhibió significativamente por la presencia del anticuerpo 4901 a 1 mg/kg administrado i.v., cuando la estimulación por pulso electrónico se aplicó a los 60 min, 90 min, y 120 min después de la administración del anticuerpo, y el incremento del flujo sanguíneo estimulado por la aplicación de pulsos electrónicos sobre el nervio safeno fue inhibido significativamente por la presencia del anticuerpo 4901 a 10 mg/kg administrado i.v., cuando se aplicó la estimulación por pulso electrónico a los 30 min, 60 min, 90 min, y 120 min después de la administración del anticuerpo. La Figura 4B muestra que el incremento del flujo sanguíneo estimulado por la aplicación de pulsos electrónicos sobre el nervio safeno se inhibió significativamente en presencia del anticuerpo 7E9 (10 mg/kg, administrado i.v.) cuando la estimulación por pulso electrónico se aplicó a los 30 min, 60 min, 90 min, y 120 min después de la administración del anticuerpo, y por la presencia del anticuerpo 8B6 (10 mg/kg, administrado i.v.) cuando la estimulación por pulso electrónico se aplicó a los 30 min después de la administración del anticuerpo.

Estos datos indican que los anticuerpos 4901, 7E9, 7D11, y 8B6 son eficaces en bloquear la actividad de CGRP como se mide por la vasodilatación cutánea inducida por la estimulación del nervio safeno en la rata.

Ejemplo 4. Caracterización del anticuerpo G1 anti-CGRP y sus variantes

Las secuencias de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo G1 anti-CGRP se muestran en la Figura 5. Los siguientes procedimientos se utilizaron para la expresión y caracterización del anticuerpo G1 y sus variantes.

Vector de expresión utilizado. La expresión del fragmento Fab de los anticuerpos estaba bajo el control de un promotor lacZ inducible por IPTG similar al que se describe en Barbas (2.001) Phage display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press pg 2.10. Vector pComb3X), aunque con modificaciones, incluida la adición y la expresión de los siguientes dominios adicionales: el dominio constante de cadena ligera Kappa humano y el dominio constante CH1 de la inmunoglobulina IgG2 humana, la región de cadena C de la Ig gamma-2, con número de registro de proteínas P01859; la cadena ligera de la inmunoglobulina kappa (homosapiens), con número de registro de proteínas CAA09181.

Preparación a pequeña escala de Fab. A partir de *E. coli* transformada (o bien utilizando células TG1 competentes por electroporación o bien célula Top competentes químicamente) con una biblioteca Fab, se utilizaron colonias sencillas para inocular tanto una placa maestra (agar LB + cabenicilina (50 µg/ml) + glucosa al 2%) y una placa de trabajo (2 ml/pocillo, en una placa de 96 pocillos/placa) en las que cada pocillo contenía 1,5 ml de LB + cabenicilina

(50 µg/ml) + glucosa al 2%. Se aplicó a la placa un sello adhesivo permeable a gases (ABgene, Surrey, R.U.). Ambas placas se incubaron a 30 °C durante 12-16 h; la placa de trabajo se agitó vigorosamente. La placa maestra se guardó a 4 °C hasta que se necesitara, mientras que las células de la placa de trabajo se aglutinaron (a 4000 rpm, 4 °C, 20 min) y se resuspendieron en 1,0 ml de LB + carbenicilina (50 µg/ml) + IPTG 0,5 mM para inducir la expresión de Fab por agitado vigoroso durante 5 h a 30 °C. Las células inducidas se centrifugaron a 4000 rpm, 4 °C durante 20 min y se resuspendieron en 0,6 ml de tampón HB-SEP Biacore (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, P20 0,005% v/v). La destrucción de las células resuspendidas HB-SEP se alcanzó por congelación (-80 °C) y después se templaron a 37 °C. Los lisados celulares se centrifugaron a 4000 rpm, 4 °C durante una hora para separar los desechos de los sobrenadantes que contenían Fab, que fueron posteriormente filtrados (0,2 µm) utilizando un sistema de ensayo Millipore Multiscreen de filtración de placas de 96 pocillos y un colector de distribución al vacío. El Biacore se utilizó para analizar los sobrenadantes filtrados inyectándolos a través del CGRP sobre el chip sensor. Los clones que expresaban Fab seleccionados por afinidad se rescataron de la placa maestra, que proporcionaron una matriz de ADN para PCR, secuenciación, y preparación de plásmidos.

Preparación de Fab a gran escala. Para obtener los parámetros cinéticos, se expresaron Fab a gran escala como sigue. Se inocularon matraces Erlenmeyer que contenían 150 ml de LB + carbenicilina (50 µg/ml) + glucosa al 2% con 1 ml de un "iniciador" de cultivo de una noche a partir de clones de *E. coli* que expresaban Fab seleccionados por afinidad. El remanente del cultivo iniciador (~3 ml) se utilizó para preparar ADN plásmidos (kit QIAprep mini-prep, Qiagen) para la secuenciación y posterior manipulación. El cultivo grande se incubó a 30 °C con agitado vigoroso hasta que se alcanzó una DO_{600nm} de 1,0 (típicamente de 12-16 h). Las células se aglomeraron centrifugándolas a 4000 rpm, 4 °C durante 20 min, y se resuspendieron en 150 ml de LB + carbenicilina (50 µg/ml) + IPTG 0,5 mM. Después de 5 h de expresión a 30 °C, las células se aglomeraron por centrifugado a 4000 rpm, 4 °C durante 20 minutos, se resuspendieron en 10 ml de tampón HBS-EP Biacore, y se destruyeron utilizando un único ciclo de congelación (-80 °C)/templado (37 °C). Los lisados celulares se aglomeraron por centrifugación a 4000 rpm, 4 °C durante 1 hora, y se recolectó el sobrenadante y se filtró (0,2 µm). Los sobrenadantes filtrados se cargaron en columnas de sefarosa Ni-NTA superflujo (Qiagen, Valencia, CA) equilibradas con PBS, pH 8, y luego se lavaron con 5 volúmenes de columna de PBS, pH 8. Los Fab individuales se eluyeron en diferentes fracciones de PBS (pH 8)+ Imidazol 300 mM. Las fracciones que contenían Fab se agruparon y dializaron en PBS, luego se cuantificaron por ELISA antes de su caracterización de afinidad.

Preparación de anticuerpos completos. Para la expresión de los anticuerpos completos, las regiones variables de cadena ligera y pesada se clonaron en vectores de expresión mamíferos y se transfecaron utilizando lipofectamina en células HEK 293 para la expresión transitoria. Los anticuerpos se purificaron utilizando proteína A siguiendo los procedimientos de referencia.

El vector pDb.CGRP.hFcG1 es un vector de expresión que comprende la cadena pesada del anticuerpo G1, y es adecuado para la expresión transitoria o estable de la cadena pesada. El vector pDb.CGRP.hFcG1 tiene las secuencias de nucleótido que corresponden a las siguientes regiones: región promotora del citomegalovirus murino (nucleótidos 7-612); un intrón sintético (nucleótidos 613-1679); la región codificante DHFR (nucleótidos 688-1253); el péptido de señal de la hormona de crecimiento humana (nucleótidos 1899-1976); la región variable de cadena pesada del G1 (nucleótidos 1977-2621); la región constante de la cadena pesada de la IgG2 humana que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con respecto a la secuencia de la IgG2 tipo silvestre; véase Eur. J. Immunol. (1.999) 29:2613-2624). El vector pDb.CGRP.hFcG1 se depositó en el ATCC el 15 de julio, 2.005, y se le asignó el Nº de registro ATCC PTA-6867.

El vector pEb.CGRP.hKGI es un vector de expresión que comprende la cadena ligera del anticuerpo G1, y es adecuado para la expresión transitoria de la cadena ligera. El vector pEb.CGRP.hKGI tiene secuencias de nucleótidos que corresponden a las siguientes regiones: la región promotora del citomegalovirus murino (nucleótidos 2-613); el intrón humano EF-1 (nucleótidos 614-1149); el péptido de señal de la hormona de crecimiento humana (nucleótidos 1160-1237); la región variable de cadena ligera del anticuerpo G1 (nucleótidos 1238-1558); la región constante de la cadena kappa humana (nucleótidos 1559-1882). El vector pEb.CGRP.hKGI se depositó en el ATCC el 15 de julio, 2.005, y se le asignó el Nº de registro ATCC PTA-6866.

Ensayo Biacore para determinación de la afinidad. Las afinidades del anticuerpo monoclonal G1 y sus variantes se determinaron a 25 °C o a 37 °C utilizando el sistema Biacore3000™ de resonancia de plasmones de superficie (SPR) (Biacore, INC, Piscataway, NJ). La afinidad se determinó capturando el CGRP biotinilado N-terminalmente o fragmentos por medio de estreptavidina pre-inmovilizada (chip sensor SA) y midiendo las cinéticas de unión de los fragmentos Fab del anticuerpo G1 o variantes tituladas a través del CGRP o fragmento en el chip. Todos los ensayos Biacore se llevaron a cabo en tampón de trabajo HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Polisorbato P20 al 0,005% v/v). Las superficies CGRP se prepararon por dilución de CGRP N-biotinilado a una concentración de menos de 0,001 mg/ml en tampón HBS-EP y se inyectó a través del chip sensor SA utilizando tiempos de contacto variables. Las superficies de baja capacidad, que corresponden con niveles <50 unidades de respuesta (RU) se utilizaron para estudios de cinética de alta resolución, mientras que las superficies de alta capacidad (aproximadamente 800 RU del CGRP capturado) se utilizaron para los estudios de concentración, selección, y determinaciones de afinidad de la solución. Los datos cinéticos se obtuvieron por disolución del Fab del

- anticuerpo G1 en serie en incrementos de dos o tres veces para concentraciones que variaban entre $1\mu\text{M}$ - $0,1\text{ nM}$ (apuntando a $0,1$ - $1,0$ x de la K_D estimada). Las muestras se inyectaron típicamente durante un minuto a $100\text{ }\mu\text{l/min}$ y se permitieron tiempos de disociación de al menos 10 minutos. Después de cada ciclo de unión, las superficies se regeneraron con NaOH 25 mM en etanol al 25% v/v, que era tolerado unos cientos de ciclos. Una serie entera de titulación (típicamente generada por duplicado) se ajustaba globalmente a un 1:1 en el modelo de unión Langmuir utilizando el programa Biaevaluation. Este devolvía una única pareja constante cinéticas de tasa de asociación y disociación (k_{on} y k_{off} respectivamente) para cada interacción de unión, cuya relación daba la constante de disociación de equilibrio ($K_D = k_{off}/k_{on}$). Las afinidades (valores de K_D) determinadas de esta manera se enumeran en las Tablas 6 y 7.
- 10 Análisis de alta resolución para las interacciones con velocidades de disociación extremadamente lentas. Para las interacciones don velocidades de disociación extremadamente lentas (en particular, del Fab del anticuerpo G1 al -CGRP humano en el chip a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), se obtuvieron las afinidades en un experimento en dos partes. El protocolo descrito anteriormente se utilizó con las siguientes modificaciones. La constante de la tasa de asociación (k_{on}) se determinó inyectando una serie de titulación de 2 vece (pro duplicado) oscilando entre 550 nM - 1 nM durante 30 seg a $100\text{ }\mu\text{l/min}$ y permitiendo solamente una fase de disociación de 30 seg. La constante de la tasa de disociación (k_{off}) se determinó inyectando tres concentraciones (alta, media y baja) de las mismas series de titulación por duplicado durante 30 seg y permitiendo una fase de disociación de 2 horas. La afinidad (K_D) de cada interacción se obtuvo combinando los valores de k_{on} and k_{off} obtenidos en ambos tipos de experimentos, como se muestra en la Tabla 5.
- 20 Determinación de la solución de afinidad por Biacore. La solución de afinidad del anticuerpo G1 para el α -CGRP de rata y F37A (19-37) α -CGRP humano se midió por Biacore a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizó una superficie de chip con gran capacidad para CGRP (se eligió la afinidad alta para α -CGRP con fines de detección) y el tampón de trabajo HBS-EP se hizo fluir a $5\mu\text{l/min}$. El fragmento Fab del anticuerpo G1 a una concentración constante de 5 nM (teniendo como objetivo estar en o por debajo de la K_D esperada de la interacción basada en la solución) se preincubó con un péptido de competencia, o bien α -CGRP de rata o F37A (19-37) α -CGRP humano, a concentraciones finales que oscilaban entre 1 nM a $1\text{ }\mu\text{M}$ en diluciones seriadas de 3 veces. Las soluciones de Fab del anticuerpo G1 en ausencia o presencia del péptido de competencia basado en la solución, se inyectaron a través del CGRP en el chip y se controlaron las respuestas de depleción de unión detectadas en la superficie del chip como resultado de la solución de competición. Estas respuestas de unión se convirtieron a "concentraciones libres de Fab" utilizando una curva de calibración, que se construyó por titulación del Fab del anticuerpo G1 solo ($5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,325$ y 0 nM) a través del CGRP del chip. Las "concentraciones libres de Fab" se dibujaron contra la concentración del péptido basado en la solución de competición utilizado para generar cada punto de dato y ajustar a un modelo de afinidad de la solución utilizando el software Biaevaluation. Las afinidades de la solución determinadas (indirectamente) de esta manera se muestran en la Tablas 5 y 7 y se utilizaron para validar las afinidades obtenidas cuando los Fab se inyectaron directamente a través de CGRP biotinilados en el chip SA. La estrecha concordancia entre las afinidades determinadas por estos dos procedimientos confirma que anclando la versión biotinilada-N del CGRP al chip, no altera su actividad de unión de su solución nativa.
- 40 La Tabla 5 a continuación, muestra las afinidades de unión del anticuerpo G1 a α -CGRP humano, β -CGRP humano, α -CGRP de rata, y β -CGRP de rata determinadas por Biacore, por flujo de fragmentos Fab a través de CGRP biotinilados-N sobre un chip SA. Para resolver mejor las afinidades de las interacciones de unión con velocidades de disociación extremadamente lentas, también se pueden determinar las afinidades en un experimento en dos partes para complementar esta orientación del ensayo, la solución de afinidad de la interacción con α -CGRP de rata también se determinó (como se describió anteriormente). La estrecha concordancia de las afinidades medidas en las orientaciones de ambos ensayos confirma que la afinidad de unión del α -CGRP de rata nativo en solución, no se altera cuando es biotinilado-N y anclado al chip SA.
- 45

Tabla 5 Afinidades de Fab del anticuerpo G1 titulados a través de CGRP en el chip

CGRP en el chip	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
α -CGRP Humano	25	$1,86 \times 10^5$	$7,80 \times 10^{-6}$	0,042 (7%, n=4)*
α -CGRP Humano	37	$5,78 \times 10^5$	$3,63 \times 10^{-5}$	0,063 (4%, n=2)*
β -CGRP Humano	37	$4,51 \times 10^5$	$6,98 \times 10^{-5}$	0,155
α -CGRP de Rata	25	$5,08 \times 10^4$	$6,18 \times 10^{-5}$	1,22(12%, n=2)*
α -CGRP de Rata	37	$1,55 \times 10^5$	$3,99 \times 10^{-4}$	2,57* (Solución $K_D=10$ (50%, n=4)**
β -CGRP de Rata	37	$5,16 \times 10^5$	$7,85 \times 10^{-5}$	0,152

CGRP en el chip	Temp. (°C)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
<p>*Las afinidades para los α-CGRP (de rata y humano) se determinaron en un experimento de alta resolución en dos partes, en el que la fase de disociación es controló durante 2 horas (los valores para k_{on}, k_{off}, y K_D representan la media de n experimentos replicados con la desviación estándar expresada en varianza porcentual). Las afinidades para β-CGRP (de rata y humanos) se determinaron por análisis global utilizando solamente una fase de disociación de 20 min, que no fue lo suficientemente precisa para cuantificar sus velocidades de disociación extremadamente lentes (sus velocidades de disociación eran probablemente más lentas que lo que se establece aquí y por tanto sus afinidades eran posiblemente incluso más altas). El Fab del anticuerpo G1 se disoció extremadamente lentamente de todos los CGRP (excepto el α-CGRP de rata) con velocidades de disociación que se aproximaban al límite de resolución del ensayo Biacore (especialmente a 25 °C). "Solución de afinidad determinada por medición de la depleción de las respuestas de unión al CGRP detectadas sobre el chip para el Fab del anticuerpo G1 pre-incubado con un competidor con base en solución α-CGRP de rata.</p>				

La Tabla 6 a continuación muestra los anticuerpos que tienen una variación en la secuencia de aminoácidos cuando se compara con el anticuerpo G1 y sus afinidades a ambos, α -CGRP de rata y α -CGRP humano. Todas las sustituciones de aminoácidos de las variantes mostradas en la Tabla 6 se describen en relación a la secuencia del G1. Las afinidades de unión de los fragmentos Fab se determinaron por Biacore haciéndolos fluir a través de CGRP sobre el chip SA.

5 Tabla 6. Secuencias de aminoácidos y datos de la afinidad de unión para las variantes del anticuerpo G1 determinadas a 37°C por Biacore.

Clon	L1	L2	H2	HC-FW3	a-rata k_{off} (1/s)	a-rata K_D (nM)	a-humano k_{off} (1/s)	a-humano K_D (nM)
G1					$3,91 \times 10^{-4}$	2,57	$3,63 \times 10^{-5}$	0,063
M1				A100L	$1,10 \times 10^{-3}$		$1,73 \times 10^{-4}$	
M2				L99A A100R	$2,6 \times 10^{-3}$	58	$3,1 \times 10^{-4}$	3
M3				L99A A100S	$2,0 \times 10^{-3}$	61	$2,1 \times 10^{-4}$	1Z
M4				L99A A100V	$1,52 \times 10^{-3}$	84,4	$6,95 \times 10^{-5}$	0,43
M5				L99A A100Y	$7,35 \times 10^{-4}$	40,8	$3,22 \times 10^{-5}$	0,20
M6				L99N	$7,84 \times 10^{-4}$	43,6	$1,33 \times 10^{-4}$	0,83
M7				L99N A100C	$9,18 \times 10^{-4}$	51,0	$2,43 \times 10^{-4}$	1,52
M8				L99N A100G	$7,45 \times 10^{-4}$	41,4	$9,20 \times 10^{-5}$	0,58
M9				L99N A100Y	n.d.	n.d.	$1,00 \times 10^{-5}$	0,06
M10				L99S A100S	$1,51 \times 10^{-3}$	83,9	$1,73 \times 10^{-4}$	1,08
M11				L99S A100T	$4,83 \times 10^{-3}$	268,3	$2,83 \times 10^{-4}$	1,77
M12				L99S A100V	$1,94 \times 10^{-3}$	107,8	$1,01 \times 10^{-4}$	0,63
M13				L99T A100G	$1,84 \times 10^{-3}$	102,2	$1,86 \times 10^{-4}$	1,16

ES 2 433 251 T5

Clon	L1	L2	H2	HC-FW3	a-rata k _{off} (1/s)	a-rata K _D (nM)	a-humano k _{off} (1/s)	a-humano K _D (nM)
M14				L99T A100K	n.d.	n.d.	1,00X10 ⁻⁵	0,06
M15				L99T A100P	1,15x10-3	63,9	1,58x10-5	0,10
M16				L99T A100S	9,96X10 ⁻⁴	55,3	1,65x10-4	1,03
M17				L99T A100V	2,06X10-3	114,4	1,85X10-4	1,16
M18				L99V A100G	1,22X10-3	67,8	7,03X10-5	0,44
M19				L99V A100R	n.d.	n.d.	1,00X10-5	0,06
M20	R28W			L99R A100L	1,44x10-3	80,0	1,36x10-4	0,85
M21	R28W			L99S	6,95X10 ⁻⁴	15,2	1,42X10-4	1,23
M22	R28W			L99T	1,10X10-3	61,1	1,16X10-4	0,73
M23	R28G			L99T A100V	7,99X10 ⁻⁴	44,4	1,30X10-4	0,81
M24	R28L			L99T A100V	1,04X10-3	57,8	1,48X10-4	0,93
M25	R28N			L99T A100V	1,4x10-3	Z6	1,4x10-4	13
M26	R28N		A57G	L99T A100V	9,24X10-4	51,3	1,48X10-4	0,93
M27	R28N T30A			L99T A100V	3,41X10-3	189,4	3,57X10-4	2,23
M28	R28N T30D		E54R A57N	L99T A100V	1,25X10-3	69,4	9,96X10-5	0,62
M29	R28N T30G			L99T A100V	3,59X10-3	199,4	3,80X10-4	2,38
M30	R28N T30G		E54K A57E	L99T A100V	6,38x10-3	354,4	5,90x10-4	3,69
M31	R28N T30G		E54K A57G	L99T A100V	3,61X10-3	200,6	3,47X10 ⁻⁴	2,17
M32	R28N T30G		E54K A57H	L99T A100V	2,96X10 ⁻³	164,4	2,71 X10 ⁻⁴	1,69
M33	R28N T30G		E54K A57N S58G	L99T A100V	9,22x10-3	512,2	7,50X10 ⁻⁴	4,69
M34	R28N T30G		E54K A57N S58T	L99T A100V	2,17X10 ⁻³	120,6	6,46X10 ⁻⁴	4,04

ES 2 433 251 T5

Clon	L1	L2	H2	HC-FW3	a-rata k _{off} (1/s)	a-rata K _D (nM)	a-humano k _{off} (1/s)	a-humano K _D (nM)
M35	R28N T30G		E54K A57S	L99T A100V	3,99X10-3	221,7	3,39X10-4	2,12
M36	R28N T30R			L99T A100V	4,79X10-3	266,1	2,39X10-4	1,49
M37	R28N T30S		A57G	L99T A100V	1,45X10-3	80,6	2,26x10-4	1,41
M38	R28N T30W			L99T A100V	5,11X10-3	283,9	2,18X10-4	1,36
M39	R28N	G50A L56T	A57N S58Y	L99T A100V	9,95X10-3	552,8	4,25X10 ⁻⁴	2,66
M40	R28N	G50A L56T	E54K A57L	L99T A100V	0,36	20000,0	1,28X10 ⁻³	8,00
M41	R28N	G50A L56T	E54K A57N E64D	L99T A100V	4,53X10-3	251,7	2,10X10-4	1,31
M42	R28N	G50A L56T	E54K A57N H61F	L99T A100V	7,52X10-3	417,8	4,17X10-4	2,61
M43	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58C	L99T A100V	4,53X10-3	251,7	2,63X10-4	1,64
M44	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	6,13X10-3	443	2,10X10-4	2,05
M45	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	5,58x10-3	259	2,11x10-4	1,85
			E64D					
M46	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E H61F	L99T A100V	2,94X10-3	163,3	5,39X10-4	3,37
M47	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58G	L99T A100V	8,23X10 ⁻³	457,2	3,32X10-4	2,08
M48	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58L	L99T A100V	0,0343	1905,6	8,42X10 ⁻⁴	5,26
M49	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58Y H61F	L99T A100V	0,0148	822,2	5,95X10 ⁻⁴	3,72
M50	R28N	G50A L56T	E54K A57R	L99T A100V	5,30X10 ⁻³	294,4	4,06X10 ⁻⁴	2,54
M51	R28N	L56I	E54K A57G	L99T A100V	1,18X10 ⁻³	65,6	1,31X10 ⁻⁴	0,82
M52	R28N	L56I	E54K A57N S58A	L99T A100V	2,29X10-3	127,2	2,81 X10 ⁻⁴	1,76
M53	R28N	L56I	E54K A57N S58G	L99T A100V	1,91X10-3	106,1	3,74X10 ⁻⁴	2,34

ES 2 433 251 T5

Clon	L1	L2	H2	HC-FW3	a-rata k _{off} (1/s)	a-rata K _D (nM)	a-humano k _{off} (1/s)	a-humano K _D (nM)
M54	R28N T30A	G50A	E54K A57N S58P	L99T A100V	2,16x10-3	120,0	1,79x10-3	11,19
M55	R28N T30A	L56S	E54K A57N S58E E64D	L99T A100V	5,85X10-3	325,0	4,78X10 ⁻⁴	2,99
M56	R28N T30D	L56S	E54K A57N H61F	L99T A100V	9,35X10-3	519,4	4,79X10 ⁻⁴	2,99
M57	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58E	L99T A100V	0,0104	1,200	3,22 X10 ⁻⁴	3,08
M58	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58I H61F	L99T A100V	Sin unión	n.d.	1,95X10-3	12,19
M59	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58N H61F	L99T A100V	0,0123	683,3	5,24X10 ⁻⁴	3,28
M60	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58R H61F	L99T A100V	0,0272	1511,1	9,11X10 ⁻⁴	5,69
M61	R28N T30G	A51H	E54Q A57N H61F	L99T A100V	5,21X10-3	289,4	4,59X10 ⁻⁴	2,87
M62	R28N T30G	A51H L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	5,75X10 ⁻³	242	5,57X10 ⁻⁴	5,86
M63	R28N	G50A	E54K	L99T	2,65X10 ⁻³	147,2	1,50X10-3	9,38
	T30G		A57N S58T	A100V				
M64	R28N T30G	G50A	E54K A57N S58V	L99T A100V	0,0234	1300,0	1,32X10-3	8,25
M65	R28N T30G	G50A L56I	E54K A57C	L99T A100V	4,07X10 ⁻³	226,1	8,03X10 ⁻⁴	5,02
M66	R28N T30G	L56I	E54K A57E	L99T A100V	5,11x10-3	283,9	5,20x10-4	3,25
M67	R28N T30G	L56I	E54K A57F	L99T A100V	1,71X10-3	95,0	8,20X10-4	5,13
M68	R28N T30G	L56I	E54K A57N S58D E64D	L99T A100V	6,76X10-3	375,6	4,28X10 ⁻⁴	2,68
M69	R28N T30G	L56I	E54K A57N S58E	L99T A100V	1,81X10-3	100,6	7,33X10-4	4,58
M70	R28N T30G	L56I	E54K A57S	L99T A100V	6,07X10-3	337,2	5,59x10-4	3,49
M71	R28N T30G	L56I	E54K A57Y	L99T A100V	2,12X10-3	117,8	1,28X10-3	8,00
M72	R28N T30G	L56S	E54K	L99T A100V	3,95X10-3	219,4	4,00X10-4	2,50

Clon	L1	L2	H2	HC-FW3	a-rata k_{off} (1/s)	a-rata K_D (nM)	a-humano k_{off} (1/s)	a-humano K_D (nM)
M73	R28N T30G	L56S	E54K A57N S58Y E64D	L99T A100V	3,00X10-3	166,7	2,55X10-4	1,59
M74	R28N T30G	L56S	E54K A57S	L99T A100V	6,03x10-3	335,0	5,97X10-4	3,73
M75	R28N T30G	L56S	E54K A57V	L99T A100V	1,87X10-2	1038,9	1,16X10-3	7,25
M76	R28N T30S	G50A L56T	A57G	L99T A100V	1,16X10-3	64,4	3,64X10-4	2,28
M77	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57D	L99T A100V	0,0143	794,4	4,77X10-4	2,98
M78	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57N S58T	L99T A100V	0,167	9277,8	1,31X10-3	8,19
M79	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57P	L99T A100V	0,19	10555,6	1,29X10-3	8,06
M80	R28N T30S	L56I	E54K A57N S58V	L99T A100V	0,0993	5516,7	2,09X10-3	13,06
M81	R28N T30S	L56S	E54K A57N S58E	L99T A100V	4,29X10-3	238,3	4,90X10-4	3,06
M82	R28N T30V	A51H L56T	A57N	L99T A100V	6,99X10-3	388,3	8,77X10-4	5,48
M83	R28N T30V	A51H L56T	E54K A57N S58M H61F	L99T A100V	Sin unión	n.d.	9,33X10-4	5,83
M84	R28N T30V	A51H L56T	E54N A57N	L99T A100V	1,76X10-2	977,8	1,08X10-3	6,75
<p>Todas las CDR incluyendo ambas CDR Kabat y Chothia. Los restos de aminoácidos se numeran secuencialmente (véase la Figura 5). Todos los clones tienen las secuencias L3+H1+H3 idénticas al G1.</p> <p>$K_D = k_{off}/k_{on}$. Todos los valores de k_{off} se determinaron en modo selección excepto aquellos que están subrayados, que fueron obtenidos por análisis global de las series de concentración de Fab (el G1 se analizó en modo de alta resolución).</p> <p>Subrayado</p> <p>Los valores de K_D se determinaron experimentalmente de esta manera midiendo k_{on}. Otros valores de k_{on} se estimaron que eran los mismos que M25.</p> <p>n.d. = no determinado</p>								

Para determinar el epítopo en el α -CGRP humano que es reconocido por el anticuerpo G1, se utilizaron los ensayos Biacore descritos anteriormente. El α -CGRP humano se consiguió como una versión N-biotinilada que capacitaba su captura de alta afinidad por medio de chips sensores SA. Se determinó la unión del fragmento Fab del G1 al α -CGRP humano en el chip en ausencia o presencia de un péptido CGRP. Típicamente, se inyectó una solución 2.000:1 mol de péptido/Fab (por ejemplo, péptido 10 μ M en Fab G1 50 nM) a través de α -CGRP humano sobre el chip. La Figura y muestra el porcentaje de unión bloqueado por el péptido competidor. Los datos mostrados en la Figura 6 muestran que los péptidos que bloquean el 100% de la unión del Fab G1 al α -CGRP humano son 1-37 (WT); 8-37,26-37,P29A (19-37), K35A (19-37), K35E (19-37), y K35M (19-37) del α -CGRP humano; 1-37 del β -CGRP (WT), 1-37 de α -CGRP de rata (WT); y 1-37 de β -CGRP de rata (WT). Todos estos péptidos están amidados en el extremo C. Los péptidos F37A (19-37) y 19-37 (el último no amidado en el extremo C) del α -CGRP humano también bloquea aproximadamente del 80% al 90% de la unión del Fab G1 al α -CGRP humano. El fragmento del péptido 19-36 (amidado en el extremo C) del α -CGRP humano; los fragmentos de péptidos 1-13 y 1-19 del α -CGRP humano (ninguno de los cuales está amidado en el extremo C); y la amilina humana, la calcitonina, y la adrenomedulina (todas amidadas en el extremo C) no compitieron por la unión del Fab G1 al α -CGRP humano en el chip. Estos datos demuestran que el G1 apunta a un epítopo del extremo C del CGRP y que tanto la identidad del

- 5 Para determinar el epítopo en el α -CGRP humano que es reconocido por el anticuerpo G1, se utilizaron los ensayos Biacore descritos anteriormente. El α -CGRP humano se consiguió como una versión N-biotinilada que capacitaba su captura de alta afinidad por medio de chips sensores SA. Se determinó la unión del fragmento Fab del G1 al α -CGRP humano en el chip en ausencia o presencia de un péptido CGRP. Típicamente, se inyectó una solución 2.000:1 mol de péptido/Fab (por ejemplo, péptido 10 μ M en Fab G1 50 nM) a través de α -CGRP humano sobre el chip. La Figura y muestra el porcentaje de unión bloqueado por el péptido competidor. Los datos mostrados en la Figura 6 muestran que los péptidos que bloquean el 100% de la unión del Fab G1 al α -CGRP humano son 1-37 (WT); 8-37,26-37,P29A (19-37), K35A (19-37), K35E (19-37), y K35M (19-37) del α -CGRP humano; 1-37 del β -CGRP (WT), 1-37 de α -CGRP de rata (WT); y 1-37 de β -CGRP de rata (WT). Todos estos péptidos están amidados en el extremo C. Los péptidos F37A (19-37) y 19-37 (el último no amidado en el extremo C) del α -CGRP humano también bloquea aproximadamente del 80% al 90% de la unión del Fab G1 al α -CGRP humano. El fragmento del péptido 19-36 (amidado en el extremo C) del α -CGRP humano; los fragmentos de péptidos 1-13 y 1-19 del α -CGRP humano (ninguno de los cuales está amidado en el extremo C); y la amilina humana, la calcitonina, y la adrenomedulina (todas amidadas en el extremo C) no compitieron por la unión del Fab G1 al α -CGRP humano en el chip. Estos datos demuestran que el G1 apunta a un epítopo del extremo C del CGRP y que tanto la identidad del
- 10
- 15

resto más terminal (F37) como su amidación son importantes para la unión.

Las afinidades de Fab G1 a las variantes del α -CGRP humano (a 37 °C) también se determinaron. La Tabla 7 a continuación muestra las afinidades medidas directamente por el titulado de Fab G1 a través de α -CGRP humano biotinilada-N y las variantes sobre el chip. Los datos de la Tabla 7 indican que el anticuerpo G1 se une al epítopo en el extremo C con F37 y G33 que son los restos más importantes. El G1 no se une al CGRP cuando un resto aminoácido extra (alanina) se añade al extremo C (que está amidado).

5 Tabla 7, Afinidades de unión de Fab G1 al α -CGRP humano y sus variantes medidas a 37 °C (véase la Tabla 4 para sus secuencias de aminoácidos

CGRP sobre el chip	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
1-37 (WT)	$4,68 \times 10^5$	$7,63 \times 10^{-5}$	0,16 (alta resolución $K_D = .06$)
19-37	$4,60 \times 10^5$	$7,30 \times 10^{-5}$	0,16
25-37	$3,10 \times 10^5$	$8,80 \times 10^{-5}$	0,28
F27A (25-37)	$3,25 \times 10^5$	$1,24 \times 10^{-4}$	0,38
V28A (25-37)	$3,32 \times 10^5$	$9,38 \times 10^{-5}$	0,28
P29A (25-37)	$2,26 \times 10^5$	$1,78 \times 10^{-4}$	0,79
T30A (25-37)	$1,79 \times 10^5$	$8,41 \times 10^{-5}$	0,47
N31A (25-37)	$2,17 \times 10^5$	$1,14 \times 10^{-4}$	0,53
V32A (25-37)	$2,02 \times 10^5$	$3,46 \times 10^{-4}$	1,71
G33A (25-37)	$2,07 \times 10^5$	0,0291	141
S34A (25-37)	$2,51 \times 10^5$	$7,64 \times 10^{-4}$	3,04
K35A (19-37)	$2,23 \times 10^5$	$2,97 \times 10^{-4}$	1,33
K35E (19-37)	$5,95 \times 10^4$	$5,79 \times 10^{-4}$	9,73
K35M (19-37)	$2,63 \times 10^5$	$1,34 \times 10^{-4}$	0,51
K35Q (19-37)	$1,95 \times 10^5$	$2,70 \times 10^{-4}$	1,38
F37A (25-37)	$8,90 \times 10^4$	$8,48 \times 10^{-3}$	95 (solución $K_D = 172$ nM)
38A (25-38A)	-	-	Sin unión detectada

10 Los datos anteriores indican que el epítopo que se une al anticuerpo G1 es en el extremo C del α -CGRP humano y los aminoácidos 33 y 37 en el α -CGRP son importantes para unirse al anticuerpo G1. También, la amidación del resto F37 es importante para la unión

15 Ejemplo 5: Efecto del anticuerpo antagonista anti-CGRP G1 sobre la vasodilatación de la piel inducida por la estimulación del nervio safeno en la rata

Para ensayar la actividad del anticuerpo anti-CGRP G1, el efecto del anticuerpo sobre la vasodilatación de la piel por estimulación del nervio safeno en la rata se ensayó utilizando el modelo de rata del Ejemplo 3. En resumen, las ratas se mantuvieron bajo anestesia con un 2% de isofluorano. Se dio tisolato de bretilio (30 mg/kg, administrado i.v.) al principio del experimento para minimizar la vasoconstricción debido a la estimulación concomitante de las fibras simpáticas del nervio safeno. La temperatura del cuerpo se mantuvo a 37 °C utilizando una sonda rectal conectada termostáticamente a una manta eléctrica de temperatura controlada. El nervio safeno de la pata derecha se expuso quirúrgicamente, se cortó proximalmente y se cubrió con papel plástico para prevenir la desecación. Se colocó una sonda doppler láser sobre el lado medio-dorsal de la piel de la garra trasera, que es la región que inerva el nervio safeno. El flujo sanguíneo de la piel, medido como flujo celular sanguíneo, se controló con un medidor de flujo doppler láser. En los experimentos para determinar los efectos del anticuerpo en las dos horas de la inyección treinta a cuarenta y cinco minutos después de la inyección de tisolato de bretilio, cuando se estableció una línea base estable de flujo (menos de un 5% de variación) durante al menos 5 minutos, el nervio se colocó sobre electrodos de platino bipolar y se estimuló eléctricamente (2 Hz, 10 V, 1 ms, durante 30 seg) y de nuevo 20 minutos más tarde. El promedio de flujo sanguíneo en respuesta a estas dos estimulaciones se utilizó para establecer la línea base de respuesta (tiempo 0) a la estimulación eléctrica. El anticuerpo G1 (1 mg/kg o 10 mg/kg) o el vehículo (PBS con Tween 20 al 0,01% a un volumen igual que el G1 a 10 mg/ml) se administraron entonces por vía intravenosa (i.v.). El

5 nervio fue posteriormente estimulado (2 Hz, 10 V, 1 ms, durante 30 seg) a los 30 min, 60 min, 90 min, y 120 min después de la administración del anticuerpo. Los animales se mantuvieron bajo anestesia durante un periodo de aproximadamente 3 horas. El cambio acumulativo del flujo sanguíneo en la piel se estimó por el área bajo la curva flujo-tiempo (AUC, lo que es igual al cambio en el flujo multiplicado por el cambio en el tiempo) para cada respuesta del flujo a las estimulaciones por pulsos eléctricos.

10 Como se muestra en la Figura 7., el incremento del flujo sanguíneo estimulado por la aplicación de pulsos eléctricos sobre el nervio safeno fue inhibido significativamente por la presencia del anticuerpo G1 a 1 mg/kg (administrado i.v.) cuando se compara con el vehículo, cuando el nervio safeno se estimuló eléctricamente a los 90 min después de la

15 administración del anticuerpo. El aumento del flujo sanguíneo estimulado por la aplicación de pulsos electrónicos sobre el nervio safeno se inhibió significativamente por la presencia del anticuerpo G1 a 10 mg/kg (administrado i.v.) cuando se comparó con el vehículo, cuando el nervio safeno fue estimulado eléctricamente a los 90 minutos y 120 minutos después de la administración del anticuerpo.

20 15 En los experimentos para determinar los efectos de los anticuerpos a lo largo de puntos en el tiempo en el ensayo del safeno, se inyectó a las ratas i.v. con las dosis indicadas de anticuerpo, 24 horas o 7 días antes de preparar al animal para la estimulación del nervio safeno como se describió anteriormente. En estos experimentos fue imposible establecer una línea base de respuesta en ratas individuales a la estimulación por pulsos eléctricos antes de la dosificación, por lo que los grupos tratados se compararon con animales dosificados con el vehículo (PBS, Tween 20 0,01%) a las 24 horas o 7 días.

25 Como se muestra en las Figuras 8 A y 8B los aumentos del flujo sanguíneo en la piel dorso-medial de la garra trasera producida por la estimulación del nervio safeno fueron inhibidos en los grupos de animales dosificados tanto con 10 mg/kg o 3 mg/kg de G1 a las 24 horas o 7 días antes de la estimulación cuando se comparan con los grupos de vehículo dosificados en los mismos puntos de tiempo.

30 30 La Figura 8C representa un análisis ajustado a la curva aplicado a los datos dosis respuesta representados en las Figuras 8 A y 8B para determinar la dosis requerida para el 50% de efecto máximo (CE₅₀). La CE₅₀ a las 24 horas es 1,3 mg/kg y la CE₅₀ a los 7 días es ligeramente más baja (0,8 mg/kg).

35 35 Ejemplo 6: Efecto agudo del anticuerpo antagonista anti-CGRP mu7E9 en un ensayo de arteria dural (ventana craneal cerrada)
Modelo de Ventana Craneal Cerrada: El propósito de este experimento fue determinar el efecto agudo de anticuerpos antagonistas anti-CGRP y compararlo con el efecto agudo del antagonista del receptor CGRP BIBN4096BS. Los experimentos se llevaron a cabo como se describió anteriormente (Williamson y col., Cephalgia 17 (4): 518- 24 (1.997)) con las siguientes modificaciones. Las ratas Sprague Dawley (300-400 g) se anestesiaron con 70 mg/kg de pentobarbital i.p. Las ratas se canularon a través de la vena yugular para el suministro de todas las drogas. Se controló la presión sanguínea con una sonda (catéter mikro-tip, Millar instruments) introducida a través de la arteria femoral hasta la aorta abdominal. Las ratas fueron traqueotomizadas y se mantuvieron con una tasa de 75 respiraciones por minuto a un volumen de 3,5 ml. Después de fijarles la cabeza en un instrumento estereotáctico y eliminarles el cuero cabelludo, se hizo una ventana de 2x6 mm en el área parietal izquierda justo lateral a la sutura sagital cortando el hueso con una sierra dentada. Utilizando un micromanipulador, se bajó un electrodo de platino bipolar en la superficie y se cubrió con un aceite mineral pesado. Lateral a la ventana del electrodo se creó otra ventana de 5x6 mm y se llenó con aceite mineral pesado a través del cual se controlaba continuamente una rama de la arteria meníngea media (MMA), con una cámara CCD y un video analizador de dimensión (Living Systems). Las ratas se dejaron no menos de 45 minutos después de la preparación. Se estableció una línea base de respuesta a la estimulación eléctrica (15 V, 10 Hz, 0,5 ms pulsos, 30 segundos) y después las ratas se dosificaron i.v. con el compuesto experimental (10 mg/kg mu7E9, 300 µg/kg de BIBN4096BS o PBS Tween 20 al 0,01%). Se hicieron estimulaciones eléctricas adicionales a los 5 (BIBN4096BS), 30, 90, y 120 minutos después de la dosificación. Todos los datos se registraron utilizando el software chart (ADIInstruments).

40 45 50 55 60 Como se muestra en la Figura 9 el mu7E9 a 10 mg/kg bloquea significativamente la dilatación de la MMA provocada por la estimulación del campo eléctrico en los 60 minutos después de la dosificación y mantiene el efecto durante la duración del ensayo (120 minutos). En comparación el BIBN4096BS bloquea la dilatación de la MMA en los 5 minutos de la dosificación pero su efecto desaparece completamente a los 90 minutos. La magnitud del bloqueo es comparable entre BIBN4096BS y mu7E9.

65 60 Ejemplo 7: Efecto crónico del anticuerpo antagonista anti-CGRP G1 en un ensayo de arteria dural (ventana craneal cerrada)

65 El propósito de este experimento fue determinar si el anticuerpo anti-CGRP podría bloquear la dilatación de la MMA estimulada eléctricamente 7 días después de la dosificación. La preparación de las ratas fue idéntica a la descrita anteriormente del experimento agudo (Ejemplo 6) con las siguientes excepciones. Las ratas se inyectaron i.v. (10 mg/kg, 3 mg/kg o 1 mg/kg de G1) 7 días antes de crear la ventana craneal cerrada, la preparación y la estimulación. Era imposible establecer una línea base de respuesta de dilatación a la estimulación eléctrica antes de la

dosificación como en el experimento agudo y por tanto los grupos de anticuerpos se compararon con la dilatación de la MMA en un vehículo (PBS, Tween 20 0,01%) dosificado al grupo control. Después de que las ratas se dejaran reposar no menos de 45 minutos, se estimuló la duramadre eléctricamente a intervalos de 30 minutos. Las estimulaciones fueron a 2,5V, 5V, 10V, 15V, y 20V, todas a 10 Hz, pulsos con una fr 0,5 ms, durante 30 segundos.

5 Como se muestra en la Figura 10 el G1 a 10 mg/kg bloqueó significativamente la dilatación de la MMA provocada por la estimulación en el intervalo de 10 a 20 voltios. Estos datos demuestran que el G1 puede bloquear la dilatación de la MMA estimulada eléctricamente hasta 7 días después de la dosificación.

10 Ejemplo 8: Modelo de sofoco a la abstinencia de morfina (para referencia)

El modelo de rata con abstinencia de morfina es un modelo de roedor establecido para los mecanismos de los sofocos en la menopausia (Sipe y col., Brain Res. 1028 (2): 191-202 (2.004); Merchenthaler y col., Maturitas 30: 307-316 (1.998); Katovich y col., Brain Res. 494: 85- 94 (1.989); Simpkins y col., Life Sciences 32: 1957- 1966 (1.983)).
 15 Básicamente las ratas son adictas a la morfina por implantación de píldoras de morfina bajo la piel. Una vez en adicción se les inyecta naloxona (un antagonista de opioides) que inmediatamente les produce la abstinencia. Esta abstinencia se acompaña por incremento de la temperatura de la piel, desciende la temperatura central corporal, se aumenta el ritmo cardíaco y se incrementa el nivel de hormona luteinizante sérica. Todos estos son similares en magnitud y tiempo a los que ocurren en los sofocos humanos (Simpkins y col., Life Sciences 32:1957-1966 (1.983)).
 20 Además, si las ratas se tratan con estradiol antes de inducir la abstinencia. Los síntomas de sofoco se reducen (Merchenthaler y col., Maturitas 30: 307- 316 (1.998)). Es por esto que se cree que el modelo de abstinencia a la morfina imita la clínica de los sofocos.

25 Las ratas ovariectomizadas se pidieron a Charles River Laboratories. Se creó la dependencia a la morfina no antes de 7 días post-ovariectomía, por la implantación de una píldora de morfina (75 mg de morfina base) subcutáneamente. Dos días más tarde se implantaron 2 píldoras más. Al día siguiente las ratas se inyectaron por vía intravenosa o bien con 4901 [**] a 10 mg/kg o bien con el vehículo (PBS, Tween al 0,01%). Dos días después de la segunda implantación las ratas se anestesiaron con ketamina (90 mg/kg) y se sujetaron ligeramente. Un termopar de temperatura de superficie se colocó con cinta a la base de la cola y un termopar rectal se utilizó para medir la 30 temperatura central. Los datos se registraron utilizando el software Chart (ADInstruments). Después de registrar 15 minutos de temperatura estable, se inyectó naloxona (1 mg/kg) subcutáneamente. La temperatura se registró continuamente durante los siguientes 60 minutos. Los resultados se muestran en las Figuras 11 A y 11B.

35 **Depósito de material Biológico**

35 Los materiales siguientes se han depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EEUU (ATCC):

Material	Anticuerpo Nº	Nº de registro ATCC	Fecha de depósito
pDb.CGRP.hFcGI	G1 cadena pesada	PTA-6867	15 de julio, 2.005
pEb.CGRP.hKGI	G1 cadena ligera	PTA-6866	15 de julio, 2.005

40 El vector pEb.CGRP.hKGI es un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena ligera y la región constante kappa de la cadena ligera; y el vector pDb.CGRP.hFcGI es un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena pesada y la región constante de la cadena pesada de la IgG2 que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos en referencia a las secuencias del tipo silvestre de la IgG2; véase Eur. J. Immunol. (1.999) 29:2613-2624).

45 Estos depósitos se hicieron bajo las estipulaciones del tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional de Depósito de Microorganismo con el Propósito de Procedimientos de Patente y Regulaciones allí expuestas (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito estará disponible por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sujeto a un acuerdo entre Rinat Neuro-science Corp. y la ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie del cultivo del depósito al público en la emisión de la pertinente Patente de Estados Unidos o en dejando abierto al público de cualquier solicitud de patente de Estados Unidos o extranjera, cualquiera que sea primero, y asegure la disponibilidad de la progenie a alguien determinado por el Comisionado de Patentes y Marcas Registradas de Estados Unidos de ser intitulado el mismo de acuerdo con el 35 USC Sección 122 y las reglas del Comisionado que persiguen lo mismo (incluyendo el CFR 37 Sección 1.14 con particular referencia al 886 OG 638)

60 El cessionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiven bajo condiciones adecuadas. Los materiales serán remplazados inmediatamente a la notificación con otro igual. La disponibilidad del material depositado no constituye una licencia de práctica de la invención en contravención de los derechos garantizados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

Secuencias de anticuerposSecuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de G1 (SEC ID Nº: 1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASATH
5 YAEAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQQLTVSS

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de G1 (SEC ID Nº: 2)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTYYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGIPARFS
GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCSQSNSQYTFGQGTKLEIK

10 CDR H1 de G1 (CDR ampliada) (SEC ID Nº: 3)
GFTFSNYWIS

CDR H2 de G1 (CDR ampliada) (SEC ID Nº: 4)
EIRSESDASATHYAEAVKG

15 CDR H3 de G1 (SEC ID Nº: 5)
YFDYGLAIQNY

CDR L1 de G1 (SEC ID Nº: 6)
KASKRVTYYVS

20 CDR L2 de G1 (SEC ID Nº: 7)
GASNRYL

CDR L3 de G1 (SEC ID Nº: 8)
SQSYNYPYT

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada de G1 (SEC ID Nº: 9)

GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTCCCTGCGTCTGTCTGC
GCTGCTCCGGTTTCACCTTCTCCAACACTACTGGATCTCCTGGTTCGTCAAGGCTCCTGGTAAAGGTCT
GGAATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCGAATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTTAAA
GGTCGTTTACCATCTCCCGTGACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGCGTG
CTGAAGACACCGCTGTTACTACTGCCGGCTACTTGACTACGGTCTGGCTATCCAGAACTACTGG
GGTCAGGGTACCCCTGGTTACCGTTCCCTCC

30 Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera de G1 (SEC ID Nº: 10)

GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCCTGTCCTGTCCCCAGGTGAACGTGCTACCCGTCTGC
AAAGCTTCCAAACGGGTTACCAACCTACGTTCTGGTACCAAGCAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCGTCTG
CTGATCTACGGTGCTTCCAACCGTTACCTCGGTATCCCAGCTCGTTCTCCGGTCCGGTACCG
ACTTCACCCCTGACCATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTACTACTGCAGTCAGTCCTACAA
CTACCCCTACACCTCGGTAGGGTACCAAACGGAAATCAAA

35 Secuencia de aminoácidos de anticuerpo entero de cadena pesada de G1 (incluyendo IgG2 modificada como se describe en el presente documento) (SEC ID Nº: 11)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWAEIRSESADASATHYAEAVKGR
FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS
TSESTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKTVERKCCVECPGPAPPVAGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTPREEQFNSTFRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNGLPSSIEKTISKQPREPQV

YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de anticuerpo entero de cadena ligera de G1 (SEC ID Nº: 12)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTYVSWYQQKPGQAPRLIYGASNRYLGIPARFSGSGSGTD
FTLTISLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSF
NRGEC

5

Secuencia de nucleótidos de anticuerpo entero de cadena pesada de G1 (incluyendo IgG2 modificada como se describe en el presente documento) (SEC ID Nº: 13)

10

GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTCAGCCAGGTGGTCCCTGCGTCTGTCCTGC
GCTGCTCCGGTTCACCTCTCCAACTAAGTGGATCTCCTGGGTCAGGCTCCTGGTAAAGGTC
TGGATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCGAAATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTTAA
AGGTCGTTTACCATCTCCCGTACAACGCTAACGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGCGT
GCTGAAGACACCGCTGTTACTACTGCCTGGCTTACTTGACTACGGTCTGGCTATCCAGAACTACTG
GGGTCAGGGTACCCGGTTACCGTTACCGTTCCCTCCGCTCCACCAAGGGCCATCTGTCTTCCCAGTGGC
CCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCC
AGAACCTGTGACCGTGTCTGGAAACTCTGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCAGCTGT
CCTGCAGTCCTCAGGTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCATCCAGCAACTTCGGCAC
CCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTCGACAAGACCGTGGAGAG
AAAGTGTGTGTGGAGTGTCCACCTGTCCAGCCCCCTCCAGTGGCGGACCATCCGTGTTCTGTTC
CCTCCAAAGCCAAAGGGACACCCGTATGATCTCCAGAACCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGAC
GTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCC
AAGACCAAGCCAAGAGAGGGCAGTTCAACTCCACCTCAGAGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTG
CACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGTGCAACAAAGGGACTGCCATCCAGC
ATCGAGAAAGACCATCTCAAGACCAAGGGACGCCAACAGAGGCCACAGGTGTATACCCCTGCCCCA
TCCAGAGAGGGAGATGACCAAGAACCAAGGGTGCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGGATTCTATCC
ACATCGCCGTGGAGTGGAGTCCAACGGACGCCAGAGAACAACTATAAGACCAACCCCTCCAATGC
TGGACTCCGACGGATCCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGG
AAACGTGTTCTTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAACTATACCCAGAAGAGCCTGTCC
CTGTCTCCAGGAAAGTAA

Secuencia de nucleótidos de anticuerpo entero de cadena ligera de G1 (SEC ID Nº: 14)

GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCCTGTCCCTGTCCCCAGGTGAACGTGCTACCCCTGTCCT
 GCAAAGCTTCCAACGGTTACCAACCTACGTTCTGGTACCAAGCAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCG
 TCTGCTGATCTACGGTCTTCAACCGTTACCTCGGTATCCCAGCTCGTTCTCCGGTCCGGTTCC
 GGTACCGACTTCACCCCTGACCATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTACTACTGCAGTC
 AGTCCTACAACACTACCCCTACACCTTCGGTCAGGGTACCAAACGGAAATCAAACGCACTGTGGCTGC
 ACCATCTGTCTTATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCGGAAC TGCCCTGTTGTG

 TGCTGAATAACTCTATCCGCGCGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCG
 GTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC
 TGACCCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC
 TGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGCTAA

Comparación de secuencias de aminoácidos de CGRP humano y de rata (α -CGRP humano (SEC ID N°: 15); β -CGRP humano (SEC ID N°: 43); α -CGRP de rata (SEC ID N°: 41); y β -CGRP de rata (SEC ID N°: 44)): NH₂-ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVKNNFPTNVGSKAF-CONH₂ (α -CGRP humano) NH₂-ACNTATCVTHRLAGLLS-
 5 RSggmVksnfVPTNVGSKAF-CONH₂ (β -CGRP humano) NH₂-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKDNFVPTNVG-
 SEAF-CONH₂ (α -CGRP de rata) NH₂-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKDNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (β -CGRP de rata)

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Rinat Neuroscience Cop. Zeller, Joerg Poulsen, Kristian Abdiche, Yasmin Pons, Jaume Sierra, Jones Rosenthal, Arnon

15 <120> Anticuerpos antagonistas dirigidos contra un péptido relacionado con el gen de la calcitonina y métodos que usan los mismos

<130> PC19499A

20 <160> 47

<170> PatentIn versión 3.3

25 <210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado

<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> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado

10

<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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR H1 de anticuerpo humanizado

10 <400> 3

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

15 <210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> CDR H2 de anticuerpo humanizado

<400> 4

Glu Ile Arg Ser Glu Ser Asp Ala Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu Ala
 1 5 10 15

25 Val Lys Gly

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR H3 de anticuerpo humanizado

5 <400> 5

Tyr Phe Asp Tyr Gly Leu Ala Ile Gln Asn Tyr
1 5 10

5 <210> 6
<211> 11
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR L1 de anticuerpo humanizado

15 <400> 6

Lys Ala Ser Lys Arg Val Thr Thr Tyr Val Ser
1 . 5 10

20 <210> 7
<211> 7

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR L2 de anticuerpo humanizado

<400> 7

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Leu
1 . 5 .

30 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> CDR L3 de anticuerpo humanizado

<400> 8

Ser Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr Thr
1 . 5 .

40 <210> 9
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Región variable de cadena pesada de un anticuerpo humanizado

50 <400> 9

	gaagttcagc tggttgaatc cgggtgggt ctggttcagc caggtggttc cctgcgtctg	60
	tcctgcgctg cttccggttt caccttctcc aactactgga tctcctgggt tcgtcaggct	120
	cctggtaaaag gtctggaatg gttgctgaa atccgttccg aatccgacgc gtccgctacc	180
	cattacgctg aagctgttaa aggtcggttc accatctccc gtgacaacgc taagaactcc	240
	ctgtacctgc agatgaactc cctgcgtgct gaagacaccg ctgttacta ctgcctggct	300
	tactttgact acggtctggc tatccagaac tactggggtc agggtaccct gtttaccggt	360
	tcctccc	366
5	<210> 10	
	<211> 321	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Región variable de cadena ligera de un anticuerpo humanizado	
	<400> 10	
	gaaatcggtc tgacccagtc cccggctacc ctgtccctgt ccccagggtga acgtgctacc	60
	ctgtcctgca aagcttccaa acgggttacc acctacgttt cctggtagcca gcagaaaccc	120
	ggtcaggctc ctcgtctgct gatctacggt gtttccaaacc gttacctcgg tatcccagct	180
	cgtttctccg gttccgggttc cggtaccgac ttcaccctga ccatctcctc cctggaaaccc	240
	gaagacttcg ctgttacta ctgcagtcag tcctacaact accccctacac ettcggtag	300
	ggtaccaaacc tggaaatcaa a	321
15	<210> 11	
	<211> 448	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo humanizado	
	<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
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
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
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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa de un anticuerpo humanizado

10 <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> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo humanizado

10

<400> 13

gaagttcagc	tggttgaatc	cgggtgggt	ctgggtcagc	caggtggttc	cctgcgtctg	60
tcctgcgtg	cttccggttt	cacccctcc	aactactgga	tctcctgggt	tcgtcaggt	120
cctggtaaaag	gtctggaatg	ggttgcgtcaa	atccgttccg	aatccgacgc	gtccgctacc	180
cattacgctg	aagctgttaa	aggtcgtttc	accatctccc	gtgacaacgc	taagaactcc	240
ctgtacactgc	agatgaactc	cctgcgtgct	gaagacacccg	ctgtttacta	ctgcctggct	300
tactttgact	acggtctggc	tatccagaac	tactggggtc	agggtaccct	ggttaccgtt	360
tcctccgcct	ccaccaaggg	cccatctgtc	ttcccactgg	ccccatgctc	ccgcagcacc	420
tccgagagca	cagccgcct	gggctgcctg	gtcaaggact	acttcccaga	acctgtgacc	480
gtgtcctgga	actctggcgc	tctgaccagc	ggcgtgcaca	ccttcccagc	tgtcctgcag	540
tcctcaggtc	tctactccct	cgcccggtg	gtgaccgtgc	catccagcaa	cttcggcacc	600
cagacctaca	cctgcaacgt	agatcacaag	ccaaagcaaca	ccaaaggtcga	caagaccgtg	660
gagagaaagt	gttgtgtgga	gtgtccacct	tgtccagccc	ctccagtggc	cggaccatcc	720
gtgttcctgt	tccctccaaa	gccaaaggac	accctgtatga	tctccagaac	cccagaggtg	780
acctgtgtgg	tggtggacgt	gtcccacgag	gacccagagg	tgcagttcaa	ctggtatgtg	840
gacggagtgg	aggtgcacaa	cgccaaagacc	aagccaagaa	aggagcagtt	caactccacc	900
ttcagagtgg	tgagcgtgct	gaccgtggtg	caccaggact	ggctgaacgg	aaaggagtat	960
aagtgttaagg	tgtccaaacaa	gggactgcca	tccagcatcg	agaagaccat	ctccaagacc	1020
aagggacagc	caagagagcc	acaggtgtat	accctgccc	catccagaga	ggagatgacc	1080
aagaaccagg	tgtccctgac	ctgtctggtg	aaggattct	atccatccga	catgcgcgtg	1140
gagtgggagt	ccaacggaca	gccagagaac	aactataaga	ccacccctcc	aatgctggac	1200
tccgacggat	ccttcttcct	gtattccaag	ctgaccgtgg	acaagtccag	atggcagcag	1260
ggaaacgtgt	tctcttgttc	cgtatgcac	gaggccctgc	acaaccacta	tacccagaag	1320
agcctgtccc	tgtctccagg	aaagtaa				1347

<210> 14

<211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa de un anticuerpo humanizado

10

<400> 14

gaaatcgttc	tgacccagtc	cccggttacc	ctgtccctgt	ccccaggtga	acgtgctacc	60
ctgtccctgca	aagcttccaa	acgggttacc	acctacgttt	cctggtacca	gcagaaaaccc	120
ggtcaggctc	ctcgctcgct	gatctacggt	gcttccaaacc	gttacctcg	tatcccagct	180
cgtttctccg	gttccgggttc	cggtacccgac	ttcaccctga	ccatctccctc	cctggaaaccc	240
gaagacttcg	ctgtttacta	ctgcagtcag	tcctacaact	acccctacac	cttcggtcag	300
ggtaccaaac	tggaaatcaa	acgcactgtg	gctgcaccat	ctgtttcat	cttccctcca	360
tctgtatgagc	agttgaaatc	cggaaactgccc	tctgttgtgt	gcctgctgaa	taacttctat	420
ccgcgcgagg	ccaaagtaca	gtggaaaggtg	gataacgccc	tccaatccgg	taactcccaag	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> humano

<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> humano

<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		

20

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> humano

25

<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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante del fragmento de alfa-CGRP humano

10 <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

15 <210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<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

25

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

35 <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

40 <210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<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

5

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

15

<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

20

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<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

30

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<400> 24

40

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

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de alfa-CGRP humano

<400> 25

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

5

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<400> 26

15

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

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

25

<400> 27

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

30

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<400> 28

Asn Asn Phe Val Ala Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe
1 5 10

40

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

50

<400> 29

Asn Asn Phe Val Pro Ala Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe
1 5 10

55

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<400> 30

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

10

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<400> 31

20

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

<210> 32

<211> 13

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

30

<400> 32

Asn	Asn	Phe	Val	Pro	Thr	Asn	Val	Ala	Ser	Lys	Ala	Phe
1						5				10		

35

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<400> 33

Asn	Asn	Phe	Val	Pro	Thr	Asn	Val	Gly	Ala	Lys	Ala	Phe
1						5				10		

45

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

50

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

55

<400> 34

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

5 <210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Fragmento de alfa-CGRP humano
 <400> 35

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

15 <210> 36
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Fragmento de alfa-CGRP humano
 <400> 36

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

25 Lys Ala Phe
 <210> 37
 <211> 18
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de alfa-CGRP humano
 35 <400> 37

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

Lys Ala
 40 <210> 38
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Fragmento de alfa-CGRP humano
 <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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de alfa-CGRP humano

10

<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

15

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Fragmento de alfa-CGRP humano

<400> 40

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

25

<210> 41

<211> 37

<212> PRT

30

<213> Rata

<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

35

<210> 42

<211> 19

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de alfa-CGRP de rata

<400> 42

5

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

10 <212> PRT
<213> humano

<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

15 <210> 44

<211> 37

20 <212> PRT
<213> Rata

<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

25

<210> 45

<211> 32

<212> PRT
<213> humano

30

<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

35

<210> 46

<211> 37
 <212> PRT
 <213> humano

5 <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

10 <210> 47
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> humano

15 <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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso en la prevención o el tratamiento de dolor de cabeza en un individuo, en donde el anticuerpo antagonista anti-CGRP es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado con una afinidad de unión (K_D) al α -CGRP humano de 50 nM o menos cuando se mide por resonancia de plamón superficial a 37 °C.
- 10 2. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al fragmento del extremo C que tiene los aminoácidos 25-37 del CGRP.
- 15 3. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une a un epítopo del extremo C dentro de los aminoácidos 25-37 del CGRP.
- 20 4. El anticuerpo para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:
- 15 a. Una CDR3 V_H como se expone en la SEC. ID Nº: 5, o una secuencia que se diferencia de la SEC. ID Nº: 5 por 1 o 2 sustituciones conservadoras de aminoácidos; y
- 20 b. Una CDR3 V_L como se expone en la SEC. ID Nº: 8, o una secuencia que se diferencia de la SEC. ID Nº: 8 por 1 o 2 sustituciones conservadoras de aminoácidos.
- 25 5. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende un dominio V_H que es al menos un 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la SEC. ID Nº: 1 y un dominio V_L que es al menos un 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la SEC. ID Nº: 2.
- 30 6. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el resto aminoacídico en la posición 99 de la SEC. ID Nº: 1 es L o está sustituido por A, N, S, T, V o R, y en el que el resto aminoacídico en la posición 100 de la SEC. ID Nº: 1 es A, o está sustituido por L, R, S, V, Y, C G, T, K o P.
- 35 7. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un V_H que comprende la SEC. ID Nº: 1 y un dominio V_L que comprende la SEC. ID Nº: 2.
- 40 8. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo es una molécula IgG, una IgM, una IgE, una IgA o una IgD, o se deriva a partir de estas.
- 45 9. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende una cadena pesada producida por el vector de expresión con Nº de registro de ATCC PTA-6867.
- 40 10. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende una cadena ligera producida por el vector de expresión con el Nº de registro de ATCC PTA-6866
- 45 11. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que consiste en una secuencia de cadena pesada de la SEC. ID Nº: 11 y una secuencia de cadena ligera de la SEC. ID Nº: 12.
- 50 12. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende una región Fc con una función efectora defectuosa.
- 55 13. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 50 14. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dolor de cabeza es una migraña con o sin aura, migraña hemipléjica, cefalea en racimo, neuralgia migrañosa, cefalea crónica, o cefalea por tensión.
- 55 15. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el anticuerpo se formula para su administración sistémica.

Figura 1

Fab	K _D (nM)	K _D (nM)	K _D (nM)	K _D (mutante/parental)							
				F27A	V28A	P29A	T30A	N31A	V32A	G33A	S34A
1-37 (WT)	19-37 ^a	25-37 ^a	0,14±0,05	1,0	1,0	26	7	9	41	1256	69
7E9	1,0	1,1±0,8	0,14±0,05	1,0	1,0	9	2,2	3	5	496	4
8B6	1,1	1,5±1,2	0,45±0,08	1,0	1,0	9	4	4	11	36	3598
10A8	2,1	2,4±1,4	1,0±0,2	1,0	1,0	9	4	4	11	82	2527
7D11	4,4	10±7	3,4±0,4	1,1	1,0	7	4	5	5	13	2152
6H2	9,3	7,8±0,2	8,5±0,5	0,9	1,0	1,0	0,8	4	86	13	420
4901	60,5	52±12	296±115	0,8	0,8	0,2	0,2	0,3	18	1,4	
14E10	79,7	91±3	117,4±0,7	0,8	0,8	11	3	18	2	1	
9B8	84,7	76±20	96±28	0,8	0,8	0,6	0,6	0,7	0,6	1,3	
13C2	94,4	86±13	137±5	0,7	0,7	0,5	0,4	0,6	0,2	0,9	
14A9	148,4	219±114	246±20	0,8	0,7	0,7	0,5	0,8	0,7	1,6	
6D5	209,9	207±26	378±22	0,8	0,7	0,5	0,4	0,6	0,5	3	
1C5	296,4	223±51	430±173	0,8	0,8	0,6	0,4	0,6	0,6	1,1	5

Figura 2A

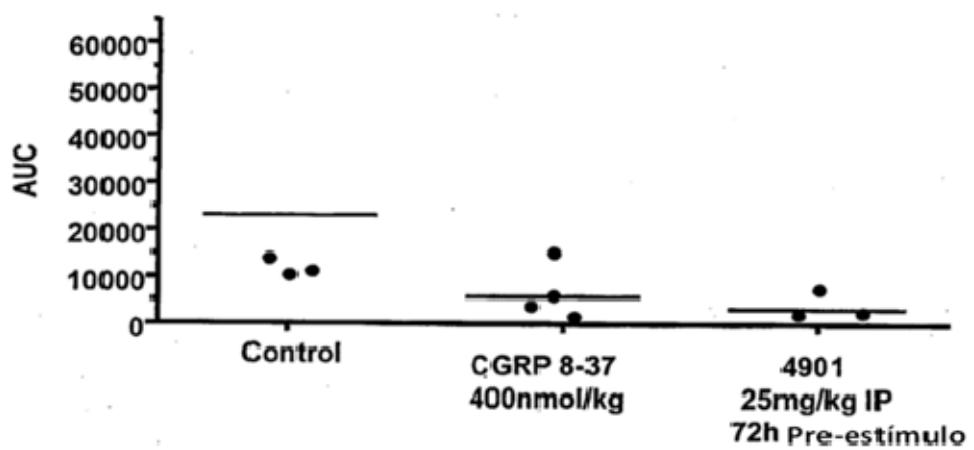


Figura 2B

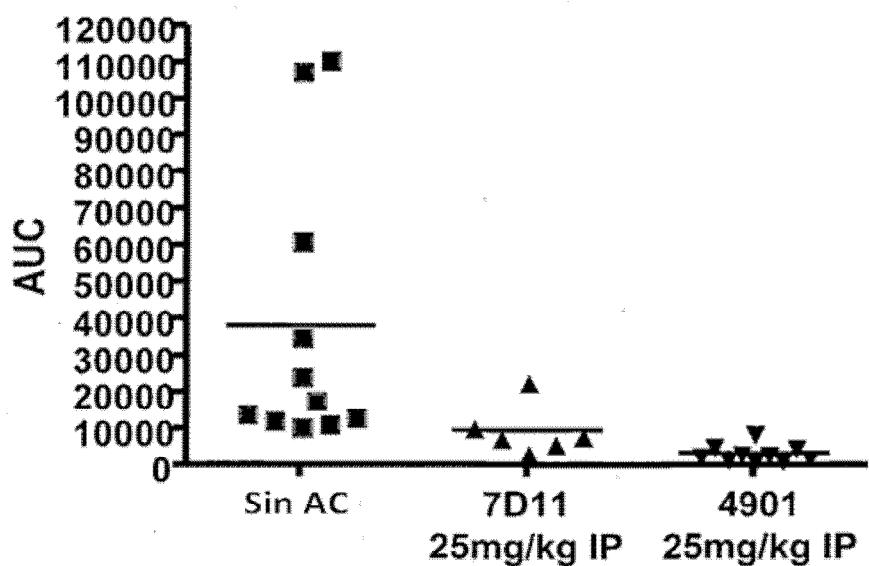


Figura 3

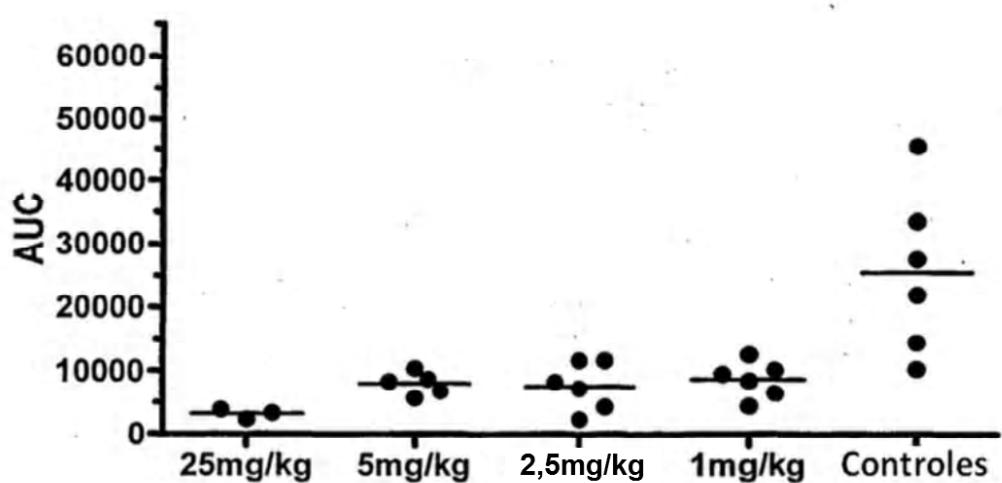


Figura 4A

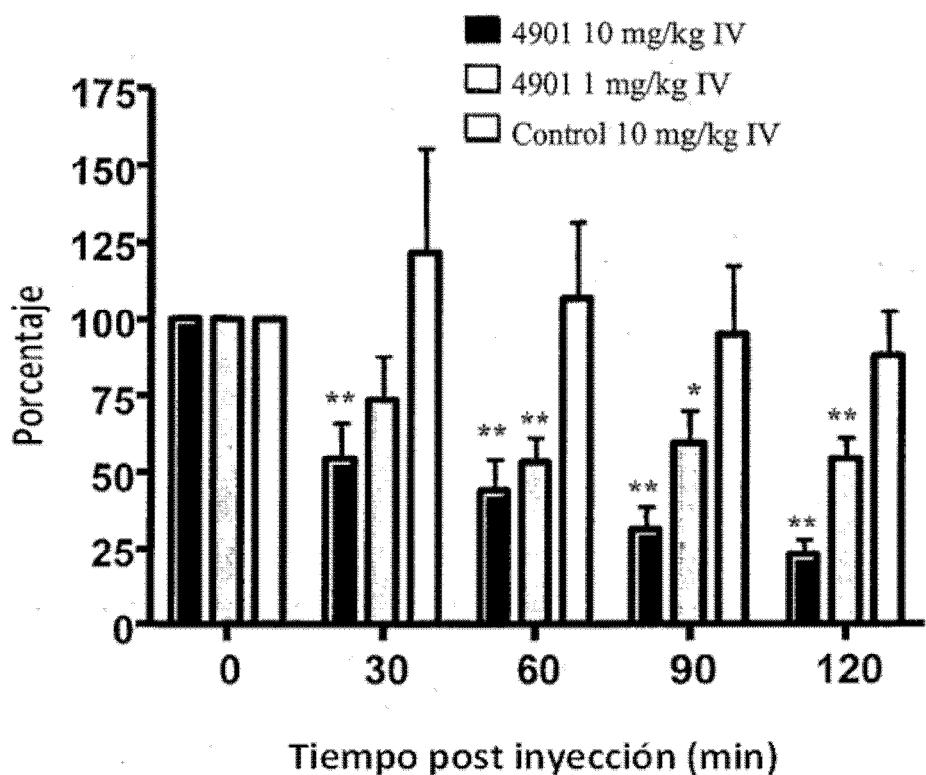


Figura 4B

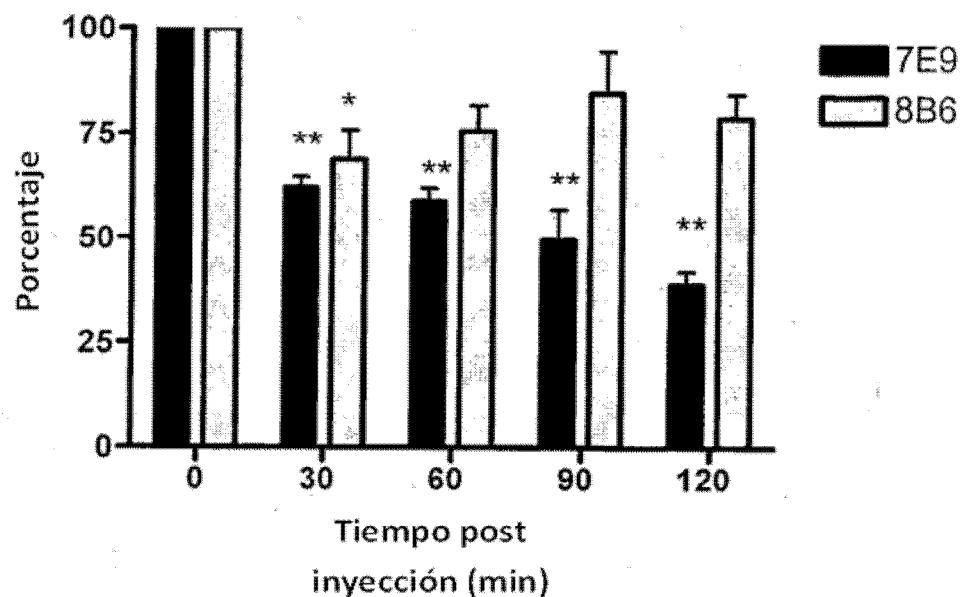


Figura 5

Negrita=CDR Kabat

Subrayado= CDR Chothia

Cadena pesada G1

1 5 10 15 20 25 30 **H1**
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
 31 35 40 45 50 55 60 **H2**
N Y W I S W V R Q A P G K G L E W V A E I R S E S D A S A T
 61 65 70 75 80 85 90
H Y A E A V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A
 91 95 100 105 110 115 120 **H3**
E D T A V Y Y C L A Y F D Y G L A I Q N Y W G Q G T L V T V
 121 122
 S S

Cadena ligera G1

1 5 10 15 20 25 30 **L1**
 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C K A S K R V T
 31 35 40 45 50 55 60 **L2**
T Y V S W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S N R Y L G I P A
 61 65 70 75 80 85 90
R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C S Q
 91 95 100 105 107 **L3**
S Y N Y P Y T F G Q G T K L E I K

Figura 6

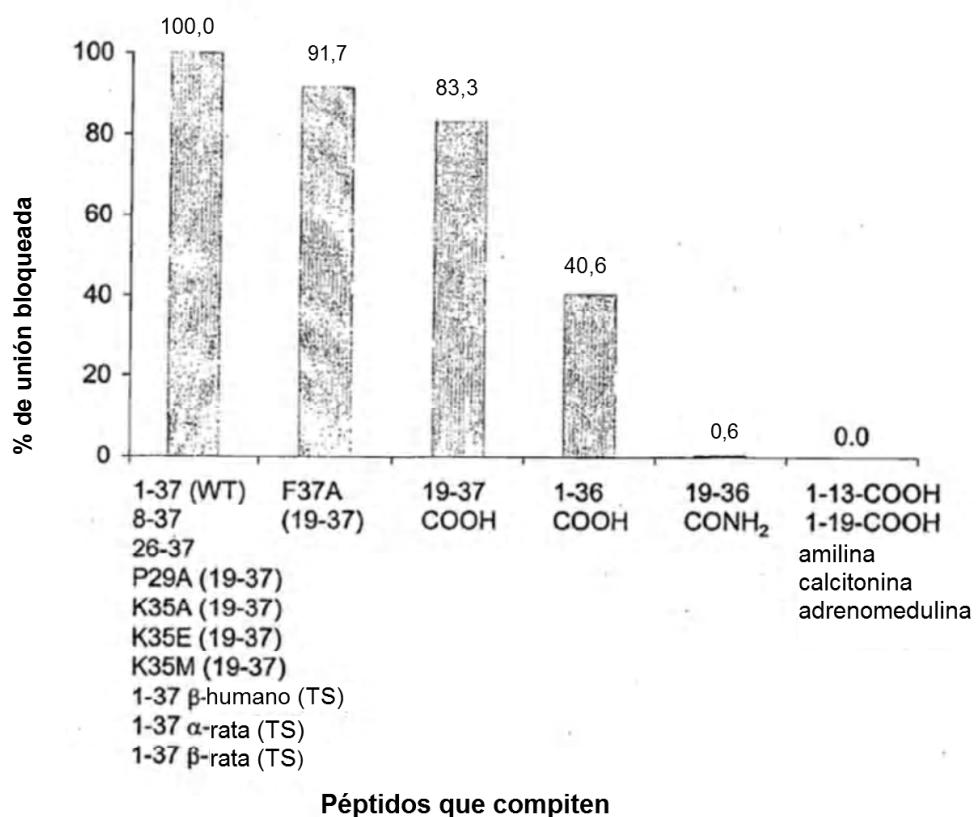


Figura 7

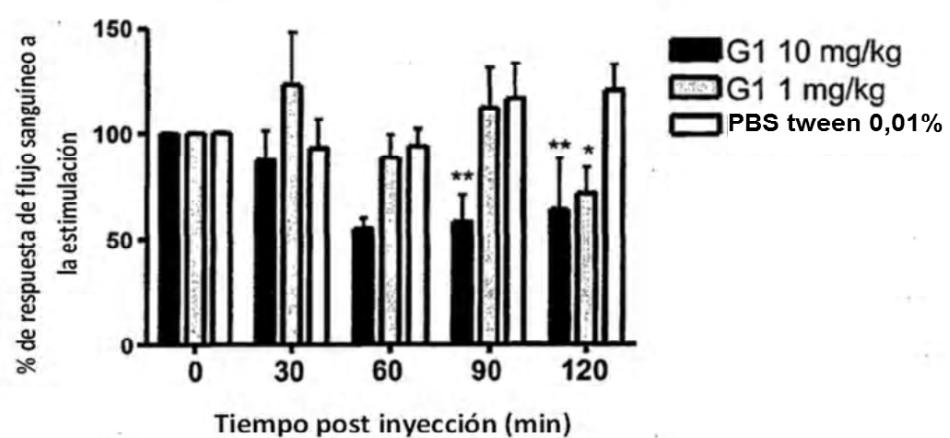


Figura 8A

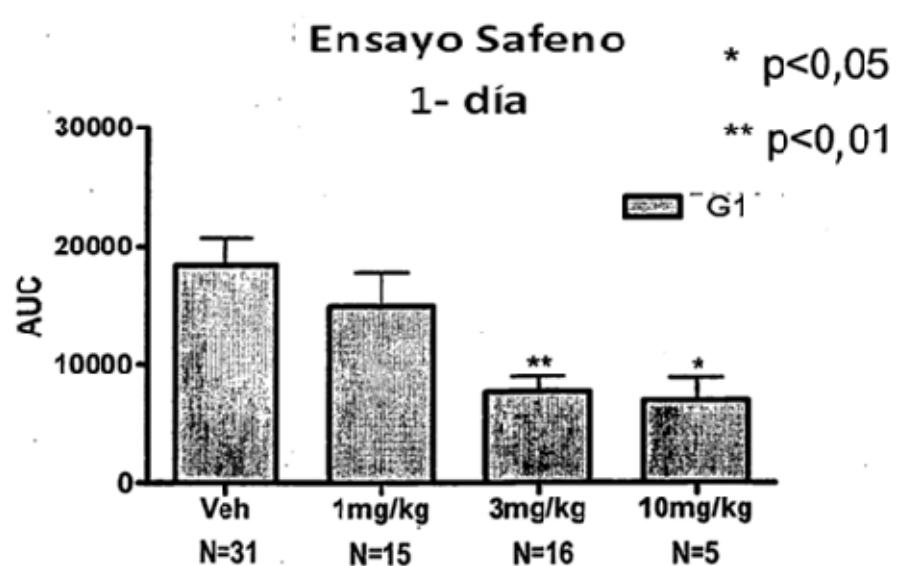


Figura 8B

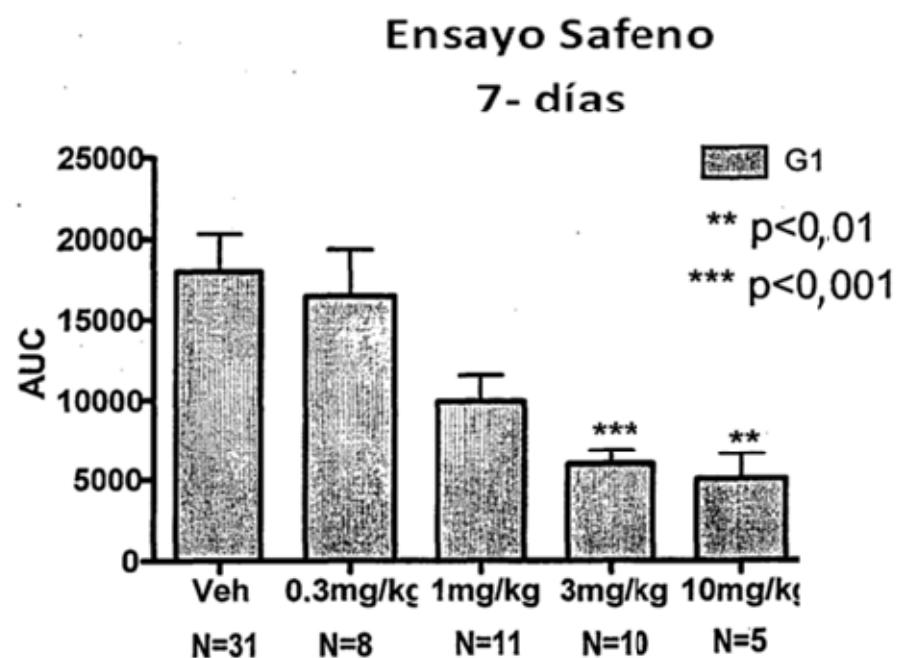


Figura 8C

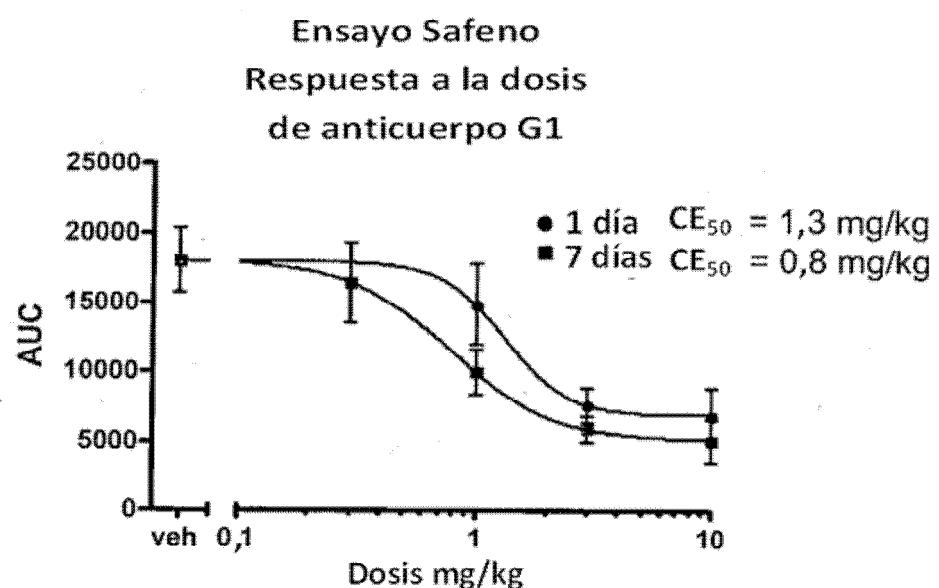


Figura 9

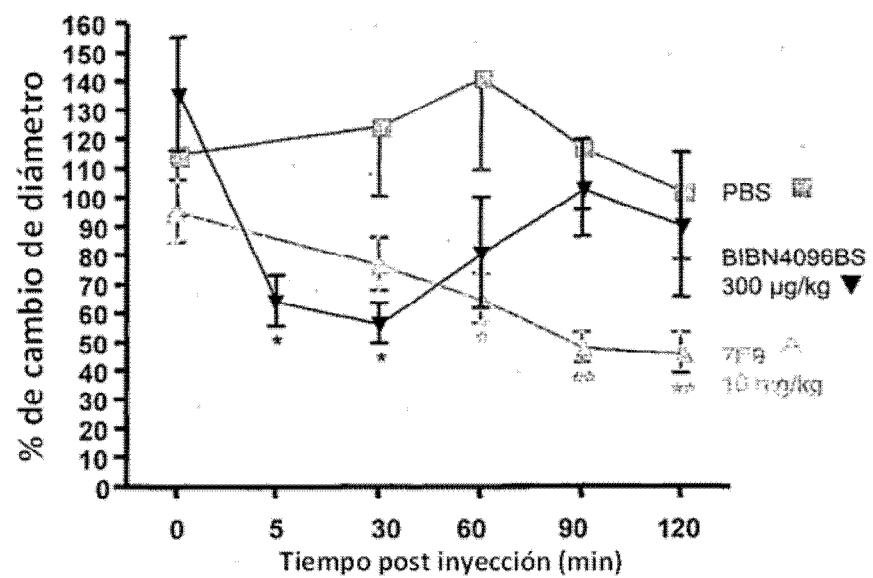


Figura 10

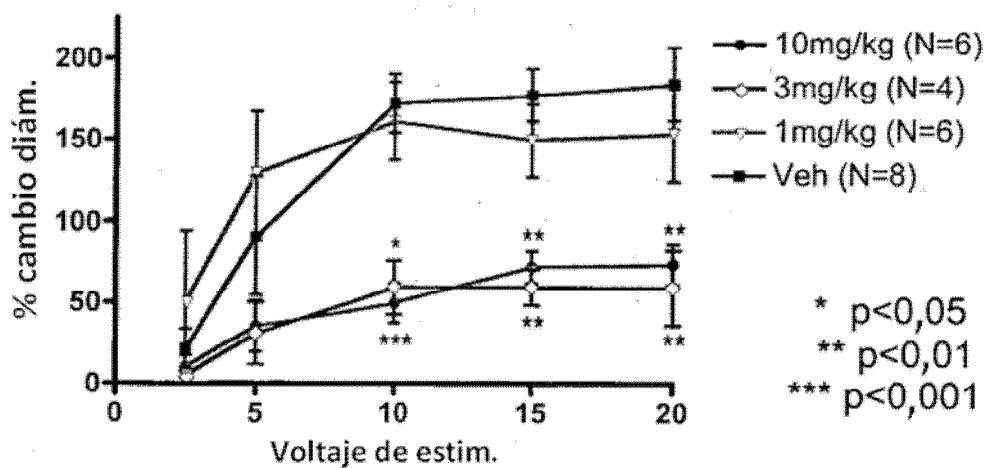


Figura 11A

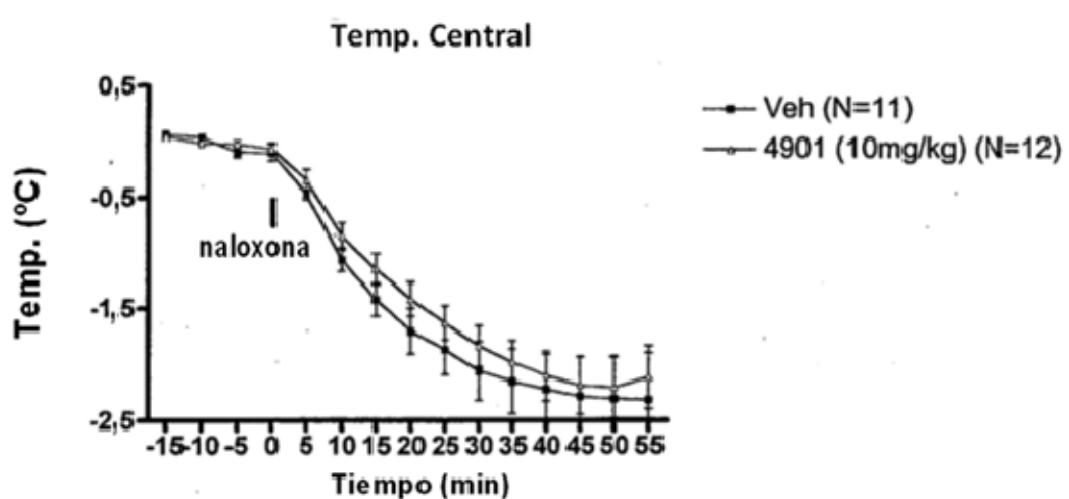


Figura 11B