



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2011.08.30

(21) Номер заявки
200801094

(22) Дата подачи заявки
2006.11.02

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 5/24 (2006.01)

(54) АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ПЕПТИДА, СВЯЗАННОГО С ГЕНОМ КАЛЬЦИТОНИНА, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 60/736,623

(32) 2005.11.14

(33) US

(43) 2008.10.30

(86) PCT/IB2006/003181

(87) WO 2007/054809 2007.05.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РИНАТ НЬЮРОСАЙЕНС КОРП. (US)

(72) Изобретатель:
**Зеллер Джоэрг, Поулсен Кристиан
Тодд, Абдич Ясмينا Нубия, Понс
Хауме, Колльер Сьерра Джонс,
Розенталь Арнон (US)**

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Борисова Е.Н. (RU)

(56) US-A1-2005234054
FROBERT Y. ET AL.: "A sensitive sandwich enzyme immunoassay for calcitonin gene-related peptide (CGRP): characterization and application". PEPTIDES 1999, vol. 20, no. 2, 1999, pages 275-284, XP002430636 ISSN: 0196-9781 the whole document
TAN K.K. ET AL.: "Calcitonin gene-related peptide as an endogenous vasodilator: immunoblockade studies in vivo with an anti-calcitonin gene-related peptide monoclonal antibody and its Fab' fragment". CLINICAL SCIENCE (LONDON, ENGLAND: 1979) DEC 1995, vol. 89, no. 6, December 1995 (1995-12), pages 565-573, XP009082539 ISSN: 0143-5221 the whole document

BUCKLEY T.L. ET AL.: "THE PARTIAL INHIBITION OF INFLAMMATORY RESPONSES INDUCED BY CAPSAICIN USING THE FAB FRAGMENT OF A SELECTIVE CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE ANTISERUM IN RABBIT SKIN" NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 48, no. 4, 1992, pages 963-968, XP000563679 ISSN: 0306-4522 the whole document

BALINT R.F. ET AL.: "ANTIBODY ENGINEERING BY PARSIMONIOUS MUTAGENESIS" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 137, no. 1, 27 December 1993 (1993-12-27), pages 109-118, XP002031537 ISSN: 0378-1119 page 110, right-hand column

LITTLE M. ET AL.: "Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 8, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 364-370, XP004215163 ISSN: 0167-5699 abstract

HOLT L.J. ET AL.: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 abstract

DAVIES J. ET AL.: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, September 1996 (1996-09), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 abstract

(57) В данном изобретении раскрыты способы профилактики или лечения расстройств, ассоциированных с пептидом, связанным с геном кальцитонина (CGRP), таких как вазомоторные симптомы, включая головную боль (например, мигрень, кластерную головную боль и головную боль напряжения) и приливы крови, путем введения антагонистического антитела против CGRP. Также описано антагонистическое антитело G1 и антитела, являющиеся производными от G1, против CGRP.

В данной заявке испрашивается приоритет заявки на патент США № 60/736623, поданной 14 ноября 2005 г., включенной в данное описание путем ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к применению антагонистических антител против CGRP для профилактики, снижения интенсивности или лечения вазомоторных симптомов, таких как головные боли, связанные с CGRP (например, мигрень), и приливы крови.

Предшествующий уровень техники

CGRP (пептид, связанный с геном кальцитонина) представляет собой нейропептид из 37 аминокислот, который относится к семейству пептидов, включающих кальцитонин, адреномедуллин и амилин. У людей существуют две формы CGRP (α -CGRP и β -CGRP), обладающих подобной активностью. Они отличаются по трем аминокислотам и демонстрируют различное распределение. По меньшей мере два подтипа рецепторов CGRP также могут являться причиной разных активностей. CGRP представляет собой нейромедиатор в центральной нервной системе, и показано, что он является сильным сосудорасширяющим агентом в периферических тканях, где нейроны, содержащие CGRP, тесно ассоциированы с кровеносными сосудами. Опосредованное CGRP расширение кровеносных сосудов также ассоциировано с нейрогенным воспалением как часть каскада событий, приводящих в результате к трансассоциации плазмы и расширению кровеносных сосудов микроциркуляторного русла, и присутствует при мигрени.

Отмечали, что CGRP возможно связан с вазомоторными симптомами (Wyon et al. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 35: 92-96 (2001); Wyon et al. *Menopause* 7(1):25-30 (2000)). Вазомоторные симптомы (VMS), такие как приливы крови и ночная потливость, представляют собой наиболее обычные симптомы, ассоциированные с менопаузой, возникающие у 60-80% всех женщин после естественной или вызванной хирургическим вмешательством менопаузы. Приливы крови вероятно представляют собой адаптивную реакцию центральной нервной системы (ЦНС) на снижение уровня половых стероидных гормонов (Freedman *Am. J. Human Biol.* 13:453-464 (2001)). К настоящему времени наиболее эффективные способы лечения приливов крови представляют собой гормональные способы лечения, включающие эстрогены и/или некоторые прогестины. Гормональные способы лечения могут быть эффективны для уменьшения интенсивности приливов крови, но не подходят для всех женщин. Считают, что наблюдаемые психологические и эмоциональные симптомы, такие как нервозность, утомляемость, возбудимость, бессонница, депрессия, потеря памяти, головная боль, тревога, нервозность или неспособность концентрироваться, вызваны лишением сна из-за прилива крови и ночной потливости (Kramer et al., In: Murphy et al., 3rd Int'l Symposium on Recent Advances in Urological Cancer Diagnosis and Treatment-Proceedings, Paris, France: SCI: 3-7 (1992)).

Мужчины также испытывают приливы крови вследствие снижения концентрации стероидных гормонов (андрогенов). Это возникает в случаях возрастного снижения уровня андрогенов (Katovich, et al., *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine*, 1990, 193(2): 129-35), а также в экстремальных случаях гормональной депривации, ассоциированной со способами лечения рака предстательной железы (Berendsen, et al., *European Journal of Pharmacology*, 2001, 419(1): 47-54). Одна треть этих пациентов испытывает устойчивые и частые, достаточно тяжелые симптомы, вызывающие значительный дискомфорт и неудобство.

CGRP представляет собой сильный сосудорасширяющий агент, который вовлечен в патологию других вазомоторных симптомов, таких как все формы сосудистой головной боли, включая мигрени (с аурой или без нее) и кластерную головную боль. Durham, *N. Engl. J. Med.* 350:1073-1075, 2004. Сывороточные уровни CGRP в наружной яремной вене повышаются у пациентов во время мигрени. Goadsby et al., *Ann. Neural.* 28:183-7, 1990. Внутривенное введение человеческого α -CGRP вызывало головную боль и мигрень у пациентов, страдающих мигренью без ауры, свидетельствуя о том, что CGRP является причиной мигрени. Lassen et al., *Cephalalgia* 22:54-61, 2002.

Возможное вовлечение CGRP в мигрень составляет основу для разработки и тестирования ряда соединений, ингибирующих высвобождение CGRP (например, суматриптан), оказывающих антагонистическое действие в отношении рецептора CGRP (например, дипептидное производное BIBN4096BS (Boehringer Ingelheim); CGRP(8-37)), или взаимодействующих с одним или более чем одним из белков, ассоциированных с рецептором, таких как мембранный белок, модифицирующий рецепторную активность (RAMP), или белок-компонент рецептора (RCP), оба из которых влияют на связывание CGRP с его рецепторами. Brain, S. et al., *Trends in Pharmacological Sciences* 23:51-53, 2002. Подтипы α -2 адренорецепторов и аденозиновых A1 рецепторов также контролируют (ингибируют) высвобождение CGRP и тригеминальную активацию (Goadsby et al., *Brain* 125:1392-401, 2002). Агонист аденозинового A1 рецептора GR79236 (метрафадил), который, как было продемонстрировано, ингибирует нейрогенное расширение кровеносных сосудов и тригеминальную ноцицепцию у людей, могут также обладать противомигренозной активностью (Arulmani et al., *Cephalalgia* 25:1082-1090, 2005; Giffin et al., *Cephalalgia* 23:287-292, 2003).

Эту теорию опровергает наблюдение того, что лечение соединениями, которые исключительно ингибируют нейрогенное воспаление (например, антагонисты тахикининового NK1 рецептора) или триге-

минальную активацию (например, агонисты рецептора 5HT_{1D}), как продемонстрировано, относительно неэффективно в качестве способов лечения мигрени, приводя некоторых исследователей к вопросу о том, является ли ингибирование высвобождения CGRP первичным механизмом действия эффективных способов противомигренозного лечения. Arulmani et al., Eur. J. Pharmacol. 500:315-330, 2004.

Мигрень представляет собой распространенное сложное неврологическое состояние, характеризующееся тяжелыми эпизодическими приступами головной боли и ассоциированными симптомами, которые могут включать тошноту, рвоту, чувствительность к свету, звукам или движению. У некоторых пациентов головной боли предшествует аура или сопровождает ее. Головная боль может быть тяжелой и также может быть односторонней у некоторых пациентов.

Приступы мигрени нарушают ежедневный образ жизни. В США и Западной Европе общая доля лиц, страдающих мигренью, составляет 11% от общей численности населения (6% мужчин; 15-18% женщин). Кроме того, средняя частота приступов у индивида составляет 1,5/месяц. Хотя существует множество способов лечения для уменьшения интенсивности или уменьшения симптомов, профилактическое лечение рекомендуется для пациентов, у которых в месяц случается более 3-4 приступов мигрени. Goadsby et al. New Engl. J. Med. 346(4): 257-275, 2002.

Различные фармакологические способы вмешательства, которые используют для лечения мигрени, и различия в реакции среди пациентов представляют собой доказательство многообразной природы данного расстройства. Таким образом, такие относительно неизбирательные лекарства, как алкалоиды спорыньи (например, эрготамин, дигидроэрготамин, метисергид), которые проявляют серотонинергическую, а также адренергическую, норадренергическую и дофаминергическую активность, использовали в течение более восьми лет для лечения мигрени. Другие способы лечения включают опиаты (например, оксикодон) и Р-адренергические антагонисты (например, пропранолол). Некоторые пациенты, обычно пациенты, имеющие более слабые симптомы, способны контролировать свои симптомы с использованием лекарственных средств, отпускаемых без рецепта, таких как один или более чем один нестероидный противовоспалительный агент (NSAID), такой как комбинация аспирина, ацетаминофена и кофеина (например, Excedrin® Migrain).

Относительно недавно некоторых пациентов, страдающих мигренью, лечили топираматом, представляющим собой противосудорожное средство, блокирующее потенциалозависимые натриевые каналы и некоторые глутаматные рецепторы (AMPA-каинат), усиливающее активность рецептора А-типа γ -аминомасляной кислоты (GABA-A) и блокирующее карбоангидразу. Относительно недавний успех применения агонистов серотониновых рецепторов 5HT-1B/1D и/или 5HT-1a, таких как суматриптан, у некоторых пациентов привел исследователей к предположению о серотонинергической этиологии этого расстройства. К сожалению, хотя у некоторых пациентов обнаруживалась хорошая реакция на лечение, другие оставались относительно резистентными к его действиям.

Выдвинуто предположение о том, что дисфункция ионного канала в аминергических ядрах ствола мозга лежит в основе этого расстройства, однако точная патофизиология мигрени пока хорошо не изучена. Продемонстрировано, что одна из форм мигрени, представляющая собой семейную гемиплегическую мигрень, ассоциирована с миссенс-мутациями в $\alpha 1$ -субъединице потенциалозависимого кальциевого канала P/Q-типа, и весьма вероятно, что другие мутации ионного канала также могут быть обнаружены в других группах пациентов. Хотя расширение кровеносных сосудов ассоциировано с болевыми симптомами мигрени и усиливает их, такими как нейрососудистые явления, в настоящее время считают, что они представляют собой скорее результат, а не причину состояния. В целом дисфункцию путей ствола мозга, модулирующую сенсорный вход, рассматривают как общий признак мигрени. Goadsby, P.J. et al., New Engl. J. Med. 346(4): 257-275, 2002.

В данной заявке на изобретение сделана ссылка на различные публикации (включая патенты и заявки на патенты). Описания этих публикаций включены здесь путем ссылки.

Краткое изложение сущности изобретения

Раскрытое здесь изобретение относится к антагонистическим антителам против CGRP и способам применения антагонистических антител против CGRP для лечения или профилактики вазомоторных симптомов, таких как головные боли, такие как мигрень с аурой или без нее, гемиплегическая мигрень, кластерные головные боли, мигренозная невралгия, хронические головные боли, головные боли напряжения и головные боли, возникающие в результате других медицинских состояний (таких как инфекция или повышенное черепное давление в результате опухоли). Другие вазомоторные симптомы включают приливы крови.

В одном из аспектов в настоящем изобретении предложен способ лечения или профилактики по меньшей мере одного вазомоторного симптома у индивида, включающий введение указанному индивиду эффективного количества антагонистического антитела против CGRP.

В одном из аспектов в настоящем изобретении предложен способ лечения или профилактики головной боли (например, мигрени и кластерной головной боли) у индивида, включающий введение указанному индивиду эффективного количества антагонистического антитела против CGRP.

В еще одном аспекте в изобретении предложен способ уменьшения интенсивности, контроля, сни-

жения частоты или сдерживания развития или прогрессирования головной боли (например, мигрени и кластерной головной боли) у индивида, включающий введение указанному индивиду эффективного количества антагонистического антитела против CGRP.

В еще одном аспекте в изобретении предложены способы уменьшения интенсивности, контроля, снижения частоты или сдерживания развития или прогрессирования головной боли (например, мигрени и кластерной головной боли) у индивида, включающий введение указанному индивиду эффективного количества антагонистического антитела против CGRP в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным агентом, полезным для лечения головной боли. Такие дополнительные агенты включают 5-HT (5-гидрокситриптами)1-подобные агонисты (и агонисты, действующие в других сайтах 5-HT1) и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID).

Примеры агонистов 5-HT1, которые могут быть использованы в комбинации с антителом против CGRP, включают класс соединений, известных как триптаны, такие как суматриптан, золмитриптан, наратриптан, ризатриптан, элетриптан, алмотриптан и фроватриптан. Также известно, что алкалоиды спорыньи и родственные соединения обладают агонистической активностью в отношении 5-HT и используются для лечения головной боли, такой как мигрень. К таким соединениям относятся эргогамма таратрат, эргоновина малеат и эрголоида мезилаты (например, дигидроэргокорнин, дигидроэргокристин, дигидроэргокриптин и дигидроэрготамина мезилат (DHE 45)).

Примеры NSAID, которые могут быть использованы в комбинации с антителом против CGRP, включают напроксен, флурбипрофен, кетопрофен, оксапрозин, этодолак, индометацин, кеторолак, набуметон, мефенамовая кислота и пироксикан. Дополнительные NSAID включают ингибиторы циклооксигеназы-2 (COX-2). Члены этой группы включают цефекоксиб; рофекоксиб; мелоксикам; JTE-522; L-745,337; NS398 и их фармацевтически приемлемые соли.

В еще одном аспекте в изобретении предложен способ уменьшения интенсивности, контроля, снижения частоты или сдерживания развития или прогрессирования приливов крови у индивида, включающий введение указанному индивиду эффективного количества антагонистического антитела против CGRP.

В еще одном аспекте в изобретении предложены способы уменьшения интенсивности, контроля, снижения частоты или сдерживания развития или прогрессирования приливов крови у индивида, включающие введение указанному индивиду эффективного количества антагонистического антитела против CGRP в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным агентом, полезным для лечения приливов крови. Такие дополнительные агенты включают гормональное лечение, включая эстрогены и/или прогестины, но не ограничены ими.

В одном из воплощений антагонистическое антитело против CGRP, используемое в любом из вышеописанных способов, представляет собой любое из описанных здесь антител.

В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP распознает человеческий CGRP. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP связывается с человеческим α -CGRP и β -CGRP. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP связывается с человеческим и крысиным CGRP. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP связывается с C-концевым фрагментом, имеющим аминокислоты 25-37 CGRP. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP связывается с C-концевым эпитопом в пределах аминокислот 25-37 CGRP.

В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP представляет собой моноклональное антитело. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP является гуманизированным. В некоторых воплощениях антитело является человеческим. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP представляет собой антитело G1 (как здесь описано). В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP содержит один или более чем один гипервариабельный участок (CDR) (например, один, два, три, четыре, пять или в некоторых воплощениях все шесть CDR) антитела G1 или вариантов G1, представленных в табл. 6. В других воплощениях антагонистическое антитело против CGRP содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную на фиг. 5 (SEQ ID NO: 1), и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, представленную на фиг. 5 (SEQ ID NO: 2).

В некоторых воплощениях антитело содержит модифицированную константную область, такую как константную область, являющуюся иммунологически инертной (включая частично иммунологически инертную), например, не запускающую лизис, опосредованный системой комплемента, не стимулирующую антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC), не активирующую микроглию или у которой одна или более чем одна из этих активностей снижена. В некоторых воплощениях константная область модифицирована, как описано в Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; международной заявке № PCT/GB 99/01441 и/или заявке на патент Великобритании № 9809951.8. В других воплощениях антитело содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG2, включающую следующие мутации: A330P331 на S330S331 (нумерация аминокислот со ссылкой на последовательность IgG2 дикого типа). Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи антитела представляет собой тяжелую цепь человеческого IgG1 с любой из следующих

мутаций:

- 1) A327A330P331 на G327S330S331;
- 2) E233L234L235G236 на P233V234A235 с делецией G236;
- 3) E233L234L235 на P233V234A235;
- 4) E233L234L235G236A327A330P331 на P233V234A235G327S330S331 с делецией G236;
- 5) E233L234L235A327A330P331 на P233V234A235G327S330S331 и
- 6) N297 на A297 или любую другую аминокислоту, за исключением N.

В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи антитела представляет собой тяжелую цепь человеческого IgG4 с любой из следующих мутаций: E233F234L235G236 на P233V234A235 с делецией G236; E233F234L235 на P233V234A235 и S228L235 на P228E235.

В других воплощениях константная область агликозилирована для N-связанного гликозилирования. В некоторых воплощениях константная область агликозилирована для N-связанного гликозилирования путем мутации остатка, по которому происходит присоединение олигосахарида (такого как Asn297) и/или фланкирующих остатков, которые представляют собой часть последовательности, распознающей N-гликозилирование, в константной области. В некоторых воплощениях константная область агликозилирована для N-связанного гликозилирования. Константная область может быть агликозилирована для N-связанного гликозилирования ферментативно или путем экспрессии в клетках-хозяевах, дефектных по гликозилированию.

Аффинность связывания (K_D) антагонистического антитела против CGRP в отношении CGRP (такого как человеческий α -CGRP, измеренная посредством поверхностно-плазмонного резонанса, при подходящей температуре, такой как 25 или 37°C) может составлять от приблизительно 0,02 до приблизительно 200 нМ. В некоторых воплощениях аффинность связывания составляет приблизительно 200, приблизительно 100, приблизительно 50, приблизительно 10, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500, приблизительно 100, приблизительно 60, приблизительно 50, приблизительно 20, приблизительно 15, приблизительно 10, приблизительно 5 или приблизительно 2 пМ. В некоторых воплощениях аффинность связывания составляет менее чем приблизительно 250, приблизительно 200, приблизительно 100, приблизительно 50, приблизительно 10, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500, приблизительно 100 или приблизительно 50 пМ.

Антагонистическое антитело против CGRP может быть введено до, во время и/или после возникновения головной боли. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP вводят перед приступом головной боли (например, мигрени и кластерной головной боли). Введение антагонистического антитела против CGRP может быть осуществлено любым из способов, известных в данной области, включая пероральный, внутривенный, подкожный, внутриартериальный, внутримышечный, внутрисердечный, интраспинальный, внутригрудной, внутрибрюшинный, интравентрикулярный, подъязычный, трансдермальный способ, и/или путем ингаляции. Введение может быть системным, например внутривенным, или местным.

В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP может быть введено в комбинации с другим агентом, таким как другой агент для лечения головной боли.

В еще одном аспекте в изобретении предложено применение антагонистического антитела против CGRP для изготовления лекарственного средства для применения в любом из описанных здесь способов, например, для лечения или профилактики головной боли.

В еще одном аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция для профилактики или лечения головной боли (например, мигрени и кластерной головной боли), содержащая эффективное количество антагонистического антитела против CGRP в комбинации с одним или более чем одним фармацевтически приемлемым эксципиентом.

В еще одном аспекте в изобретении предложен набор для применения в любом из описанных здесь способов. В некоторых воплощениях набор содержит контейнер, композицию, содержащую вышеописанное антагонистическое антитело против CGRP, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, и инструкции по применению композиции в любом из описанных здесь способов.

В настоящем изобретении также предложены антагонистические антитела против CGRP и полипептиды, имеющие происхождение из антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6. Соответственно, в одном из аспектов изобретение представляет собой антитело G1 (взаимозаменяемым образом называемое "G1"), которое продуцируется экспрессирующими векторами, имеющими номера РТА-6866 и РТА-6867 в Американской коллекции типовых культур АТСС. Например, одно из воплощений представляет собой антитело, включающее тяжелую цепь, продуцируемую экспрессирующим вектором, имеющим номер РТА-6867 в АТСС. Еще один аспект представляет собой антитело, включающее легкую цепь, продуцируемую экспрессирующим вектором, имеющим номер РТА-6866 в АТСС. Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи G1 показаны на фиг. 5. Фрагменты гиперварибельного участка (CDR) антитела G1 (включающей CDR Чотиа и Кабата) также показаны на фиг. 5. Понятно, что ссылка на любую часть или целую область G1 охватывает последовательности, продуцируемые экспрессирующими векторами, имеющими номера РТА-6866 и РТА-6867 в АТСС, и/или последовательности, представленные на фиг. 5. В изобретении также предложены варианты

антитела G1 с аминокислотными последовательностями, представленными в табл. 6.

В одном из аспектов изобретение представляет собой антитело, включающее домен V_H , который по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичен по аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1.

В еще одном аспекте изобретение представляет собой антитело, включающее домен V_L , который по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичен по аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2.

В еще одном аспекте изобретение представляет собой антитело, включающее фрагмент или область антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6. В одном из воплощений фрагмент представляет собой легкую цепь антитела G1. В еще одном воплощении фрагмент представляет собой тяжелую цепь антитела G1. В еще одном воплощении фрагмент содержит одну или более чем одну вариабельную область легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1. В еще одном воплощении фрагмент содержит одну или более чем одну вариабельную область легкой цепи и/или тяжелой цепи, представленную на фиг. 5. В еще одном воплощении фрагмент содержит один или более чем один CDR легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1.

В еще одном аспекте в изобретении предложены полипептиды (которые могут представлять собой или не представлять собой антитело), включающие V_H CDR3, как представлено в SEQ ID NO: 5, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 5 по 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотным заменам. В конкретном воплощении такие аминокислотные замены представляют собой консервативные замены.

В еще одном аспекте в изобретении предложены полипептиды (которые могут представлять собой или не представлять собой антитело), включающие V_L CDR3, как представлено в SEQ ID NO: 8, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 8 по 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотным заменам. В конкретном воплощении такие аминокислотные замены представляют собой консервативные замены.

В еще одном аспекте изобретения предложены полипептиды (которые могут представлять собой антитело или могут не представлять собой антитело), включающие любой один или более чем один из следующих: а) один или более чем один CDR антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; б) CDR H3 тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; в) CDR L3 легкой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; г) три CDR легкой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; д) три CDR тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; е) три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6. В изобретении также предложены полипептиды (которые могут представлять собой антитело или могут не представлять собой антитело), включающие любой один или более чем один из следующих: а) один или более чем один (один, два, три, четыре, пять или шесть) CDR, имеющих происхождение из антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; б) CDR, имеющий происхождение из CDR H3 тяжелой цепи антитела G1; и/или в) CDR, имеющий происхождение из CDR L3 легкой цепи антитела G1. В некоторых воплощениях CDR представляет собой CDR, представленный на фиг. 5. В некоторых воплощениях один или более чем один CDR, имеющий происхождение из антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 86%, по меньшей мере приблизительно на 87%, по меньшей мере приблизительно на 88%, по меньшей мере приблизительно на 89%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, или по меньшей мере приблизительно на 99% идентичен по меньшей мере одному, по меньшей мере двум, по меньшей мере трем, по меньшей мере четырем, по меньшей мере пяти или по меньшей мере шести CDR G1 или его вариантов.

В некоторых воплощениях CDR представляет собой CDR Кабата. В других воплощениях CDR представляет собой CDR Чотиа. В других воплощениях CDR представляет собой комбинацию CDR Кабата и Чотиа (также называемую "комбинированный CDR" или "расширенный CDR"). Другими словами, для любого из данных воплощений, содержащих более чем один CDR, CDR может представлять собой любой из CDR Кабата, Чотиа и/или комбинированный.

В некоторых воплощениях полипептид (такой как антитело) содержит аминокислотную последовательность KASKXaaVXaaTYVS, где Xaa в положении 5 представляет собой R, W, G, L или N; и где Xaa в положении 7 представляет собой T, A, D, G, R, S, W или V. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность KASKXaaVXaaTYVS представляет собой CDR1 легкой цепи антитела.

В некоторых воплощениях полипептид (такой как антитело) содержит аминокислотную последова-

тельность ХааХааSNRYХаа, где Хаа в положении 1 представляет собой G или A; где Хаа в положении 2 представляет собой A или H; и где Хаа в положении 7 представляет собой L, T, I или S. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность ХааХааSNRYХаа представляет собой CDR2 легкой цепи антитела.

В некоторых воплощениях полипептид (такой как антитело) содержит аминокислотную последовательность EIRSХааSDХааХааATХааYAXааAVKG, где Хаа в положении 5 представляет собой E, R, K, Q или N; где Хаа в положении 8 представляет собой A, G, N, E, H, S, L, R, C, F, Y, V, D или P; где Хаа в положении 9 представляет собой S, G, T, Y, C, E, L, A, P, I, N, R, V, D или M; где Хаа в положении 12 представляет собой H или F; где Хаа в положении 15 представляет собой E или D. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность EIRSХааSDХааХааATХааYAXааAVKG представляет собой CDR2 тяжелой цепи антитела.

В некоторых воплощениях полипептид (такой как антитело) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где аминокислотный остаток в положении 99 SEQ ID NO: 1 представляет собой L или замещен на A, N, S, T, V или R; и где аминокислотный остаток в положении 100 в SEQ ID NO: 1 представляет собой A или замещен на L, R, S, V, Y, C, G, T, K или P.

В некоторых воплощениях антитело по изобретению представляет собой человеческое антитело. В других воплощениях антитело по изобретению представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых воплощениях антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых воплощениях антитело (или полипептид) является выделенным. В некоторых воплощениях антитело (или полипептид) является, по существу, чистым.

Константная область тяжелой цепи антител может иметь любой из типов константной области, такой как IgG, IgM, IgD, IgA и IgE; и любой изотип, такой как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

В некоторых воплощениях антитело содержит модифицированную константную область, описанную здесь.

В еще одном аспекте в изобретении предложен полинуклеотид (который может быть выделен), включающий полинуклеотид, кодирующий фрагмент или область антитела G1, или его варианты, представленные в табл. 6. В одном из воплощений фрагмент представляет собой легкую цепь антитела G1. В еще одном воплощении фрагмент представляет собой тяжелую цепь антитела G1. В еще одном воплощении фрагмент содержит одну или более чем одну вариабельную область легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1. В еще одном воплощении фрагмент содержит один или более чем один (т.е. один, два, три, четыре, пять или шесть) гипервариабельный участок (CDR) легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1.

В еще одном аспекте изобретение представляет собой полинуклеотид (который может быть выделен), включающий полинуклеотид, кодирующий антитело G1 или его варианты, представленные в табл. 6. В некоторых воплощениях полинуклеотид включает любой или оба полинуклеотида, представленные в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

В еще одном аспекте в изобретении предложены полинуклеотиды, кодирующие любое из описанных здесь антител (включая фрагменты антител) или полипептидов.

В еще одном аспекте в изобретении предложены векторы (включая экспрессирующие и клонирующие векторы) и клетки-хозяева, включающие любые из раскрытых здесь полинуклеотидов. В некоторых воплощениях вектор представляет собой pDb.CGRP.hFcG1, имеющий № PTA-6867 ATCC. В других воплощениях вектор представляет собой pEb.CGRP.hKGI, имеющий № PTA-6866 ATCC.

В еще одном аспекте изобретение представляет собой клетку-хозяина, включающую полинуклеотид, кодирующий любое из описанных здесь антител.

В еще одном аспекте изобретение представляет собой комплекс CGRP, связанного с любыми описанными здесь антителами или полипептидами. В некоторых воплощениях антитело представляет собой антитело G1 или его варианты, представленные в табл. 6.

В еще одном аспекте изобретение представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую эффективное количество любого из описанных здесь полипептидов (включая антитела, такие как антитело, включающее один или более чем один CDR антитела G1) или полинуклеотидов и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В еще одном аспекте изобретение представляет собой способ получения антитела G1, включающий культивирование клетки-хозяина или ее потомства в условиях, которые обеспечивают продуцирование антитела G1, где клетка-хозяин содержит экспрессирующий вектор, кодирующий антитело G1; и в некоторых воплощениях очистку антитела G1. В некоторых воплощениях экспрессирующий вектор включает одну или обе полинуклеотидные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

В еще одном аспекте в изобретении предложены способы получения любого из описанных здесь антител или полипептидов путем экспрессии одного или более чем одного полинуклеотида, кодирующего антитело (которые могут быть экспрессированы раздельно в виде одной легкой или тяжелой цепи, или легкой и тяжелой цепи, обе, экспрессируются с одного вектора) или полипептид в подходящей клетке, как правило, с последующим извлечением и/или выделением интересующего антитела или полипептида.

Антагонистическое антитело против CGRP и полипептиды, а также полинуклеотиды, кодирующие

антитела и полипептиды по настоящему изобретению, могут быть использованы для лечения, профилактики, уменьшения интенсивности, контроля или снижения частоты заболеваний, ассоциированных с аномальной функцией CGRP, таких как головная боль (например, мигрень, кластерная головная боль, хроническая головная боль и головная боль напряжения) и другие состояния, которые можно лечить или предупреждать посредством антагонистической активности в отношении CGRP.

В еще одном аспекте в изобретении предложены наборы и композиции, содержащие любую одну или более чем одну из описанных здесь композиций. Эти наборы, как правило, находящиеся в подходящей упаковке и снабженные подходящими инструкциями, полезны для любых из описанных здесь способов.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена таблица, демонстрирующая аффинности связывания 12 мышинных антител в отношении различных аланинзамещенных фрагментов человеческих α -CGRP. Аффинности связывания измеряли при 25°C с использованием Biacore при помощи потока Fab через CGRP на чипе. Значения в рамке представляют потерю аффинности аланиновых мутантов по отношению к родительскому фрагменту 25-37 (курсив) за исключением K35A, который получен из родительского 19-37. ^a означает аффинности в отношении фрагментов 19-37 и 25-37 и представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение для двух независимых измерений на различных сенсорных чипах. ^b означает данные взаимодействия, отклоняющиеся от модели простого бимолекулярного взаимодействия из-за бифазного аномального режима, так что их аффинности определяли с использованием модели конформационного изменения. Шкала полутонов: белый (1,0) означает родительскую аффинность; светло-серый (менее чем 0,5) означает более высокую аффинность по сравнению с родительской; темно-серый (более 2) означает более низкую аффинность по сравнению с родительской и черный означает отсутствие связывания.

На фиг. 2A и 2B показан эффект введения CGRP 8-37 (400 нмоль/кг), антитело 4901 (25 мг/кг) и антитело 7D11 (25 мг/кг) на кровоток в коже, измеренный в виде потока клеток крови после стимуляции электрическим импульсом в течение 30 с. CGRP 8-37 вводили внутривенно (в.в.) за 3-5 мин до стимуляции электрическим импульсом. Антитела вводили внутривенно (в.в.) за 72 ч до стимуляции электрическим импульсом. Каждая точка на графиках представляет собой площадь под кривой (AUC) для крысы, которую лечили в указанных условиях. Каждая линия на графиках представляет собой среднюю AUC для крыс, которых лечили в указанных условиях. AUC (площадь под кривой) равна Δ поток \times Δ время. " Δ поток" представляет собой изменение единиц потока после стимуляции электрическим импульсом; и " Δ время" представляет собой период времени для уровня потока клеток крови для возвращения к уровню до стимуляции электрическим импульсом.

На фиг. 3 показан эффект введения различных доз антитела 4901 (25, 5, 2,5 или 1 мг/кг) на кровоток в коже, измеренный в виде потока клеток крови после стимуляции электрическим импульсом в течение 30 с. Антитела вводили внутривенно (в.в.) за 24 ч до стимуляции электрическим импульсом. Каждая точка на графике представляет собой AUC для одной крысы, которую лечили в указанных условиях. Линия на графике представляет собой среднюю AUC для крыс, которых лечили в указанных условиях.

На фиг. 4A и 4B показан эффект введения антитела 4901 (1 или 10 мг/кг, в.в.), антитела 7E9 (10 мг/кг, в.в.) и антитела 8B6 (10 мг/кг, в.в.) на кровоток в коже, измеренный в виде потока клеток крови после стимуляции электрическим импульсом в течение 30 с. Антитела вводили внутривенно (в.в.) с последующей стимуляцией электрическим импульсом через 30, 60, 90 и 120 мин после введения антитела. Ось Y представляет процент AUC по сравнению с уровнем AUC без введения антитела (время 0). Ось X представляет период времени (минуты) между введением антител и стимуляцией электрическим импульсом. * означает $P < 0,05$ и ** означает $P < 0,01$ по сравнению со временем 0. Данные анализировали с использованием одностороннего ANOVA и теста множественных сравнений Даннета.

На фиг. 5 представлена аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 1) и варибельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 2) антитела G1. CDR Кабата выделены жирным шрифтом, а CDR Чотиа подчеркнуты. Аминокислотные остатки варибельной области тяжелой цепи и легкой цепи пронумерованы последовательно.

На фиг. 6 представлено картирование эпитопа антитела G1 посредством пептидной конкуренции с использованием Biacore. N-Биотинилированный человеческий α -CGRP прикрепляли к сенсорному чипу SA. G1 Fab (50 нМ) в отсутствие конкурентного пептида или после предварительной инкубации в течение 1 ч с 10 мкМ конкурентного пептида пропускали через чип. Измеряли связывание G1 Fab с человеческим α -CGRP на чипе. Ось Y представляет процент связывания, блокируемого вследствие присутствия конкурирующего пептида, по сравнению со связыванием в отсутствие конкурирующего пептида.

На фиг. 7 показан эффект введения антитела G1 (1 или 10 мг/кг, в.в.) или разбавителя (забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS), 0,01% Tween 20) на кровоток в коже, измеренный в виде потока клеток крови после стимуляции электрическим импульсом в течение 30 с. Антитело G1 или разбавитель вводили внутривенно (в.в.) с последующей стимуляцией нерва электрическим импульсом через 30, 60, 90 и 120 мин после введения антитела. Ось Y представляет процент AUC по сравнению с уровнем AUC без введения антитела или разбавителя (определенного как 100%) (время 0). Ось X пред-

ставляет период времени (минуты) между введением антитела и стимуляцией электрическим импульсом. * означает $P < 0,05$ и ** означает $P < 0,01$ по сравнению с разбавителем. Данные анализировали с использованием двухстороннего ANOVA и апостериорного теста Бонферрони.

На фиг. 8А показан эффект введения антитела G1 (1, 3 или 10 мг/кг, в.в.) или разбавителя (PBS, 0,01% Tween 20) на кровоток в коже, измеренный в виде потока клеток крови после стимуляции электрическим импульсом в течение 30 с через 24 ч после введения дозы. Антитело G1 или разбавитель вводили внутривенно (в.в.) за 24 ч до стимуляции нерва электрическим импульсом. Ось Y представляет общую площадь под кривой (изменение потока клеток крови, умноженное на изменение времени от стимуляции до возвращения потока до базового уровня, AUC). Ось X представляет различные дозы антитела G1. * означает $P < 0,05$ и ** означает $P < 0,01$ по сравнению с разбавителем. Данные анализировали с использованием одностороннего ANOVA и теста множественного сравнения Данна.

На фиг. 8В показан эффект введения антитела G1 (0,3, 1, 3 или 10 мг/кг, в.в.) или разбавителя (PBS, 0,01% Tween 20) на кровоток в коже, измеренный в виде потока клеток крови после стимуляции электрическим импульсом в течение 30 с через 7 суток после введения дозы. Антитело G1 или разбавитель вводили внутривенно (в.в.) за 7 суток до стимуляции нерва электрическим импульсом. Ось Y представляет общую AUC. Ось X представляет различные дозы антитела G1. ** означает $P < 0,01$ и *** означает $P < 0,001$ по сравнению с разбавителем. Данные анализировали с использованием одностороннего ANOVA и теста множественного сравнения Данна.

На фиг. 8С представлен анализ подгонки кривой с данными из фиг. 8А и 8В. Антитело G1 или разбавитель вводили внутривенно (в.в.) за 24 ч или 7 суток до стимуляции нерва электрическим импульсом. Ось Y представляет общую AUC. Ось X представляет различные дозы антитела G1 в мг/кг в логарифмической шкале для определения средней эффективной концентрации EC50.

На фиг. 9 показан эффект антитела m7E9 (10 мг/кг), BIBN4096BS или разбавителя (PBS, 0,01% Tween 20) на изменение диаметра средней менингеальной артерии после стимуляции электрическим полем. Антитело m7E9, BIBN4096BS или разбавитель вводили внутривенно (в.в.) в момент времени 0 мин после оценки базового ответа на электрическую стимуляцию. Ось Y представляет изменение диаметра средней менингеальной артерии после стимуляции электрическим полем. Диаметр в свободном состоянии соответствует 0%. Ось X представляет время (минуты) стимуляции электрическим импульсом. * означает $P < 0,05$ и ** означает $P < 0,01$ по сравнению с разбавителем. Данные анализировали с использованием одностороннего ANOVA и теста множественного сравнения Данна.

На фиг. 10 показан эффект различных доз антитела G1 (1, 3 или 10 мг/кг, в.в.) или разбавителя (PBS, 0,01% Tween 20) на изменение диаметра средней менингеальной артерии после стимуляции электрическим полем. Антитело G1 или разбавитель вводили внутривенно (в.в.) за 7 суток до стимуляции электрическим полем. Ось Y представляет изменение диаметра средней менингеальной артерии. Диаметр в спокойном состоянии соответствует 0%. Ось X представляет стимулирующее напряжение. * означает $P < 0,05$, ** означает $P < 0,01$ и *** означает $P < 0,001$ по сравнению с разбавителем. Данные анализировали с использованием двухстороннего ANOVA и апостериорного теста Бонферрони.

На фиг. 11А показан эффект антитела m4901 (10 мг/кг) или разбавителя (PBS, 0,01% Tween 20), введенного внутривенно (в.в.) за 24 ч, на уменьшение внутренней температуры, вызванное подкожной инъекцией налоксона (1 мг/кг) у крыс, страдающих зависимостью от морфина. Ось Y представляет разницу температур, исходя из базового значения. Ось X представляет время, измеренное с момента инъекции налоксона.

На фиг. 11В показан эффект антитела m4901 (10 мг/кг) или разбавителя (PBS, 0,01% Tween 20), введенного внутривенно (в.в.) за 24 ч, на увеличение поверхностной температуры хвоста, вызванное подкожной инъекцией налоксона (1 мг/кг) у крыс, страдающих зависимостью от морфина. Ось Y представляет разницу температур, исходя из базового значения. Ось X представляет время, измеренное с момента инъекции налоксона.

Подробное описание изобретения

В раскрытом здесь изобретении предложены способы лечения и/или профилактики вазомоторных симптомов, таких как головная боль (например, мигрень, кластерная головная боль, хроническая головная боль и головная боль напряжения) или прилив крови, у индивида путем введения указанному индивиду терапевтически эффективного количества антагонистического антитела против CGRP.

В раскрытом здесь изобретении также предложены антагонистические антитела против CGRP и полипептиды, имеющие происхождение из G1, или его варианты, представленные в табл. 6. В изобретении также предложены способы получения и применения этих антител и полипептидов.

Общие способы.

При практическом применении настоящего изобретения, если не указано иначе, используют общепринятые способы молекулярной биологии (включая рекомбинантные технологии), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах знаний специалиста в данной области техники. Такие способы полностью описаны в литературе, такой как Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cel-

lis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, и D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti и J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Определения.

"Антитело" представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную специфически связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и так далее, по меньшей мере через один сайт распознавания антигена, расположенный в варибельной области молекулы иммуноглобулина. Используемый здесь термин охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, а также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одну цепь (ScFv), их мутанты, слитые белки, включающие фрагмент антитела (такие как доменные антитела), и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, включающую сайт распознавания антигена. Антитело включает антитело любого класса, такое как IgG, IgA или IgM (или их подкласс), и антитело не обязательно должно принадлежать к какому-либо конкретному классу. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей антитела, иммуноглобулина можно отнести к различным классам. Существуют пять основных классов иммуноглобулинов IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них дополнительно могут быть разделены на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, названы α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Хорошо известны структуры и трехмерные конфигурации субъединиц различных классов иммуноглобулинов.

Используемый здесь термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции, по существу, гомогенных антител, то есть индивидуальные антитела, включающие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут быть представлены в минорных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны, направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в противоположность препаратам поликлонального антитела, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты антигена. Определение "моноклональное" указывает на природу антитела, получаемого, по существу, из гомогенной популяции антител, и не должен рассматриваться как требующий, чтобы антитела были получены каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены гибридомным способом, впервые описанным Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495, или могут быть получены способами рекомбинантной ДНК, такими как описано в патенте США № 4816567. Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек, создаваемых с использованием способов, описанных, например, в McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554.

Используемые здесь "гуманизированные" антитела относятся к формам антител, не являющихся человеческими (например, мышинным), представляющим собой специфические химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, имеющую происхождение из иммуноглобулина, не являющегося человеческим. Большой частью гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки гиперварибельного участка (CDR) реципиента замещены остатками CDR видов, не являющихся человеческими (донорное антитело), таких как мышь, крыса или кролик, обладающие желаемой специфичностью, аффинностью и биологической активностью. В некоторых случаях остатки каркасной области Fv (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими остатками, не являющимися человеческими. Кроме того, гуманизированное антитело может включать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в последовательностях донорного CDR или каркасной области, а включены для дополнительного улучшения и оптимизации функции антитела. Как правило, гуманизированное антитело включает, по существу, все по меньшей мере из одного и, как правило, двух варибельных доменов, в которых все или по существу все области CDR соответствуют областям иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и все или по существу все области FR представляют собой области консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело оптимально также включает, по меньшей мере, фрагмент константной области или домен (Fc) иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Антитела могут иметь Fc-области, модифи-

цированные, как описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизированных антител имеют один или более чем один CDR (один, два, три, четыре, пять, шесть), которые изменены относительно исходного антитела, которые также названы как один или более чем один CDR, "имеющий происхождение из" одного или более чем одного CDR исходного антитела.

Используемое здесь "человеческое антитело" означает антитело, имеющее аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности антитела, продуцируемого человеком, и/или полученного с использованием любого из способов получения человеческих антител, известных в данной области техники или раскрытых здесь. Это определение человеческого антитела включает антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина или по меньшей мере один полипептид легкой цепи человеческого иммуноглобулина. Один из таких примеров представляет собой антитело, включающее полипептиды легкой цепи мышинового антитела и полипептиды тяжелой цепи человеческого антитела. Человеческие антитела могут быть получены с использованием различных способов, известных в данной области техники. В одном из воплощений человеческого антитело выбрано из фаговой библиотеки, экспрессирующей человеческие антитела (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS, (USA)* 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Человеческие антитела также могут быть получены путем введения локуса человеческого иммуноглобулина трансгенным животным, например мышам, в которых гены эндогенных иммуноглобулинов частично или полностью инактивированы. Этот подход описан в патентах США №№ 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425 и 5661016. Альтернативно, человеческое антитело может быть получено путем иммортализации человеческих В-лимфоцитов, которые продуцируют антитело, направленное против антигена-мишени (такие В-лимфоциты могут быть выделены у индивидуума или могут быть иммунизированы *in vitro*). См., например, Cole et al., *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., 1991, *J. Immunol*, 147 (1):86-95 и патент США № 5750373.

Использованный здесь термин "пептид, связанный с геном кальцитонина" и "CGRP" относится к любой форме пептида, связанного с геном кальцитонина, и его вариантам, которые сохраняют по меньшей мере часть активности CGRP. Например, CGRP может представлять собой α -CGRP или β -CGRP. Использованный здесь CGRP включает все виды нативной последовательности CGRP млекопитающих, например человека, собаки, кошки, лошади и быка.

Использованный здесь термин "антагонистическое антитело против CGRP" (взаимозаменяемым образом называемое "антитело против CGRP") относится к антителу, способному связываться с CGRP и ингибировать биологическую активность CGRP и/или последующий(ие) сигнальный(ые) путь(и), опосредованный(ые) CGRP. Антагонистическое антитело против CGRP охватывает антитела, которые блокируют, оказывают антагонистическое действие, подавляют или уменьшают (в том числе существенно) биологическую активность CGRP, включая последующие сигнальные пути, опосредованные CGRP, такие как связывание рецептора и/или индуцирование клеточного ответа на CGRP. Для задач настоящего изобретения понятно, что термин "антагонистическое антитело против CGRP" охватывает все ранее идентифицированные термины, наименования и функциональные состояния и характеристики, посредством которых сам CGRP, биологическая активность CGRP (включая его способность опосредовать любые виды головной боли, но не ограниченные ею) или проявления биологической активности, по существу, сводятся к нулю, уменьшаются или нейтрализуются в любой значимой степени. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP связывает CGRP и предотвращает связывание CGRP с рецептором CGRP. В других воплощениях антитело против CGRP связывает CGRP и предотвращает активацию рецептора CGRP. Здесь приведены примеры антагонистических антител против CGRP.

Используемые здесь термины "G1" и "антитело G1" используют взаимозаменяемым образом для ссылки на антитело, продуцируемое экспрессирующими векторами, имеющими номера РТА-6867 АТСС и РТА-6866 АТСС. Аминокислотная последовательность переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи представлена на фиг. 5. Фрагменты CDR антитела G1 (включая CDR Чотиа и Кабата) схематически показаны на фиг. 5. Полинуклеотиды, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепи, представлены в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Характеристика G1 описана в примерах.

Термины "полипептид", "олигопептид", "пептид" и "белок" используют здесь взаимозаменяемым образом для ссылки на полимеры аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, может включать модифицированные аминокислоты и может быть прерван фрагментами, не являющимися аминокислотами. Эти термины также охватывают аминокислотный полимер, модифицированный естественным путем или путем вмешательства; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидизация, ацетилирование, фосфорилирование или любая другая манипуляция или модификация, такая как конъюгирование с метящим компонентом. Также в определение включены, например, полипептиды, содержащие один или более чем один аналог аминокислоты (включающий, например, неприродные аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные в данной области техники. Следует понимать, что поскольку полипептиды по изобретению основаны на антителе, данные полипептиды могут существовать в виде единичных цепей или ассоциированных цепей.

Используемые здесь взаимозаменяемым образом "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги или любой субстрат, который может быть включен в полимер посредством ДНК- или РНК-полимеразы. Полинуклеотид может включать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Если присутствует модификация нуклеотидной структуры, она может быть произведена перед или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, таким образом как конъюгирование с метящим компонентом. Другие типы модификаций включают, например, "кэпы", замещение одного или более чем одного из встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, межнуклеотидные модификации, такие как, например, модификации незаряженными связями (например метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфоамидаты, карбаматы и т.д.) и заряженными связями (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.д.), содержащие боковые группировки, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.д.), со вставками (например, акридин, псорален и т.д.), содержащие хелатообразователи (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т.д.), содержащие алкиляторы, с модифицированными связями (например, α -аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Кроме того, любая из гидроксильных групп, обычно присутствующих в сахарах, может быть замещена, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищена стандартными защитными группами, или активирована с получением дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или может быть конъюгирована с твердыми носителями. 5'- и 3'-концевая группа ОН может быть фосфорилирована или замещена аминами или органическими экзипирующими группировками из 1-20 атомов углерода. Другие гидроксилы также могут быть преобразованы до стандартных защитных групп. Полинуклеотиды также могут содержать аналогичные формы рибозных или дезоксирибозных сахаров, которые в общем известны в данной области техники, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидорибозу, карбоциклические аналоги сахаров, α -аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и неосновные нуклеозидные аналоги, такие как метилрибозид. Одна или более чем одна фосфодифирная связь может быть замещена альтернативными связывающими группами. Эти альтернативные связывающие группы включают воплощения, в которых фосфат замещен на P(O)S ("тиоат"), P(S)S ("дитиоат"), (O)NR₂ ("амидат"), P(O)R, P(O)OR, CO или CH₂ ("формацеталь"), в которых каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), возможно содержащий эфирную (-O-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил, но не ограничены ими. Не все связи в полинуклеотиде должны быть идентичными. Предшествующее описание применимо ко всем упомянутым здесь полинуклеотидам, включая РНК и ДНК.

"Вариабельная область" антитела относится к вариабельной области легкой цепи антитела или вариабельной области тяжелой цепи антитела, одной или в комбинации. Вариабельные области каждой из тяжелой и легкой цепей состоят из четырех каркасных областей (FR), связанных тремя областями, определяющими комплементарность (CDR), также известными как гипервариабельные участки. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости посредством FR и вместе с CDR другой цепи вносят вклад в формирование антигенсвязывающего сайта антител. Существуют по меньшей мере два способа определения CDR: (1) подход, основанный на вариабельности последовательности между видами (т.е. Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); и (2) подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело (Al-lazikani et al. (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). Используемый здесь CDR может относиться к CDR, определенному любым из подходов или комбинацией обоих подходов.

"Константная область" антитела относится к константной области легкой цепи антитела или константной области тяжелой цепи антитела, одной или в комбинации.

Эпитоп, который "предпочтительно связывается" или "специфически связывается" (используют здесь взаимозаменяемым образом) с антителом или полипептидом, представляет собой термин, хорошо понятный в данной области техники, и способы определения такого специфического или предпочтительного связывания хорошо известны в данной области техники. Считают, что молекула демонстрирует "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание", если она взаимодействует или ассоциирует чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или большей аффинностью с конкретной клеткой или веществом по сравнению с альтернативными клетками или веществами. Антитело "специфически связывается" или "предпочтительно связывается" с мишенью, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью по сравнению с его связыванием с другими веществами. Например, антитело, которое специфически или предпочтительно связывается с эпитопом CGRP, представляет собой антитело, которое связывается с этим эпитопом с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью по сравнению с его связыванием с

другими эпитопами CGRP или эпитопами, отличающимися от эпитопов CGRP. При прочтении этого описания также должно быть понятно, что, например, антитело (или группировка или эпитоп), которое специфически или предпочтительно связывается с первой мишенью, может специфически или неспецифически или предпочтительно связываться со второй мишенью. Само по себе "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание" не обязательно требует (хотя может включать) исключительное связывание. Как правило, но не обязательно, ссылка на связывание означает предпочтительное связывание.

Использованный здесь "по существу чистый" относится к веществу, которое по меньшей мере на 50% является чистым (то есть не содержит примесей), более предпочтительно по меньшей мере на 90% является чистым, более предпочтительно по меньшей мере на 95% является чистым, более предпочтительно по меньшей мере на 98% является чистым, более предпочтительно по меньшей мере на 99% является чистым.

"Клетка-хозяин" включает индивидуальную клетку или культуру клеток, которая может представлять собой или представляет собой реципиент для вектора(ов) для включения полинуклеотидных вставок. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и это потомство не обязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или по комплементарности геномной ДНК) исходной родительской клетке вследствие природной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(ами) по изобретению.

Термин "Fc-область" используют для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина. "Fc-область" может представлять собой Fc-область нативной последовательности или Fc-область варианта. Хотя связи Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяют как продолжающуюся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбоксильного конца. Нумерация остатков в Fc-области представляет собой нумерацию как в европейском индексе (EU) в соответствии с Kabat. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. Fc-область иммуноглобулина, как правило, включает два константных домена: CH2 и CH3.

Использованный здесь "Fc-рецептор" и "FcR" описывает рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительный FcR представляет собой нативную последовательность человеческого FcR. Кроме того, предпочтительный FcR представляет собой рецептор, который связывается с антителом IgG (γ -рецептор), и включает рецепторы подклассов Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, включая аллельные варианты и формы, возникающие в результате альтернативного сплайсинга этих рецепторов. Рецепторы Fc γ RII включают Fc γ RIIA (активирующий рецептор) и Fc γ RIIB (ингибирующий рецептор), имеющие сходные аминокислотные последовательности, которые отличаются в основном по их цитоплазматическим доменам. Обзор FcR приведен в Ravetch and Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel et al., 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; и de Haas et al., 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41. FcR также включает неонатальный рецептор FcRn, который ответственен за перенос материнских IgG эмбриону (Guyer et al., 1976, *J. Immunol.*, 117:587; и Kim et al., 1994, *J. Immunol.*, 24:249).

"Комплементзависимая цитотоксичность" и "CDC" относятся к лизису мишени в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом), находящейся в комплексе с когнатным антигеном. Для оценки активации комплемента может быть осуществлен анализ CDC, например, как описано Gazano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

"Функциональная Fc-область" обладает по меньшей мере одной эффекторной функцией Fc-области нативной последовательности. Примеры "эффекторных функций" включают связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание с Fc-рецептором; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; отрицательную негативную регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и так далее. Для таких эффекторных функций, как правило, требуется, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, переменным доменом антитела), и она может быть оценена с использованием различных анализов, известных в данной области техники для оценки таких эффекторных функций антитела.

"Fc-область нативной последовательности" включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, обнаруживаемой в природе. "Вариант Fc-области" включает аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности Fc-области модификацией по меньшей мере одной аминокислоты, но в то же время сохраняет по меньшей мере одну эффекторную функцию Fc-области нативной последовательности. Предпочтительно вариант Fc-области имеет замену по меньшей мере одной аминокислоты по сравнению с Fc-областью нативной последовательности или с Fc-областью родительского полипептида, например приблизительно от одной до десяти замен аминокислот и предпочтительно приблизительно от одной до пяти замен аминокислот в Fc-области нативной последовательности или в Fc-области родительского полипептида. Вариант Fc-области здесь предпочтительно обладает по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности с Fc-областью нативной последовательности и/или с Fc-областью роди-

тельского полипептида и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности с Fc-областью нативной последовательности и/или с Fc-областью родительского полипептида.

Используемая здесь "антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность" и "ADCC" относится к клеточноопосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, клетки натуральные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис этой клетки-мишени. Активность ADCC интересующей молекулы может быть оценена с использованием анализа ADCC *in vitro*, такого как описано в патенте США № 5500362 или 5821337. Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и клетки NK. Альтернативно или дополнительно, активность ADCC интересующей молекулы может быть оценена *in vivo*, например, в животной модели, такой как раскрыто в Dunes et al., 1998, PNAS (USA), 95:652-656.

Используемый здесь термин "лечение" представляет собой подход для достижения благоприятных или желаемых клинических результатов. Для задач данного изобретения благоприятные или желаемые клинические результаты включают один или более чем один из следующих: улучшение состояния при любом виде головной боли, включая уменьшение тяжести, уменьшение интенсивности боли и другие ассоциированные симптомы, уменьшающие частоту рецидивов, улучшение качества жизни лиц, страдающих головной болью, и уменьшение дозы других лекарственных препаратов, требующихся для лечения головной боли, но не ограничены ими. Для мигрени другие ассоциированные симптомы включают тошноту, рвоту и чувствительность к свету, звуку и/или движению, но не ограничены ими. Для кластерной головной боли другие ассоциированные симптомы включают припухлость под глазами или вокруг глаз, чрезмерное слезоотделение, красные глаза, ринорею или заложенность носа и покраснение лица, но не ограничены ими.

"Снижение частоты" головной боли означает любое из уменьшения частоты (которая может включать уменьшение потребности и/или количества (например, воздействия) других лекарств и/или способов лечения, как правило, применяемых при данном состоянии, включающих, например, эрготамин, дигидроэрготамин или триптаны при мигрени), длительности и/или частоты (включающих, например, задержку или увеличение времени следующей эпизодической атаки у индивида). Как понятно специалисту в данной области техники, индивиды могут отличаться с точки зрения их ответа на лечение, и, например, термин "способ снижения частоты головной боли у индивида" сам по себе отражает введение антагонистического антитела против CGRP, основываясь на рациональном ожидании того, что такое введение вероятно может вызывать такое снижение частоты у такого конкретного индивида.

"Уменьшения интенсивности" головной боли или одного или более чем одного симптома головной боли означает уменьшение или улучшение одного или более чем одного симптома головной боли по сравнению с отсутствием введения антагонистического антитела против CGRP. "Уменьшение интенсивности" также включает укорочение или уменьшение длительности симптома.

Используемый здесь термин "контроль головной боли" относится к поддержанию или уменьшению тяжести или длительности одного или более чем одного симптома головной боли или частоты приступов головной боли у индивида (по сравнению с уровнем перед лечением). Например, длительность или тяжесть головной боли или частота приступов уменьшается, по меньшей мере, приблизительно на любое из следующих: 10, 20, 30, 40, 50, 60 или 70% у индивида по сравнению с уровнем до лечения.

Используемый здесь термин "замедление" развития головной боли означает задержку, воспрепятствование, сдерживание, торможение, стабилизацию и/или отсрочку развития заболевания. Это замедление может иметь варьирующую длительность по времени, зависит от истории заболевания и/или индивидуума, которого лечат. Как очевидно специалистам в данной области техники, достаточное или значительное замедление, может, в сущности, охватывать профилактику, так что у индивидуума не развивается головная боль (например, мигрень). Способ, который "замедляет" развитие симптома, представляет собой способ, который снижает вероятность развития симптома в данный период времени и/или снижает степень симптомов в данный период времени по сравнению с тем, когда этот способ не применяют. Такие сравнения, как правило, основаны на клинических исследованиях с использованием статистически значимого количества субъектов.

"Развитие" или "прогрессирование" головной боли означает исходные проявления и/или прогрессирование расстройства. Развитие головной боли может быть обнаружимо и оценено с использованием стандартных клинических способов, таких как хорошо известные в области техники. Тем не менее, развитие также относится к прогрессированию, которое может быть необнаружимым. Для задачи данного изобретения развитие или прогрессирование относится к биологическому течению симптомов. "Развитие" включает возникновение, рецидив и начало. Используемый здесь термин "начало" или "возникновение" головной боли включает исходное возникновение и/или рецидив.

Используемый здесь термин "эффективная доза" или "эффективное количество" лекарства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для того, что-

бы привести к благоприятным или желаемым результатам. Для профилактического применения благоприятные или желаемые результаты включают результаты, такие как устраняющие или снижающие риск, уменьшающие тяжесть или задерживающие начало заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, проявляющиеся при развитии заболевания. Для терапевтического применения благоприятные или желаемые результаты включают клинические результаты, такие как уменьшение интенсивности боли, длительности или частоты приступов головной боли и уменьшение одного или более чем одного симптома, возникающего в результате головной боли (биохимического, гистологического и/или поведенческого), включая ее осложнения и промежуточные патологические фенотипы, представленные при развитии заболевания, увеличение качества жизни индивидов, страдающих этим заболеванием, снижение дозы других лекарственных средств, требующихся для лечения заболевания, усиление эффекта другого лекарственного средства и/или замедление прогрессирования заболевания пациентов. Эффективная доза может быть введена в виде одного или более чем одного введения. Для задач изобретения эффективная доза лекарства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для осуществления профилактического или терапевтического прямого или опосредованного лечения. Как следует из клинического контекста, эффективная доза лекарства, соединения или фармацевтической композиции может быть достигнута или не достигнута в сочетании с другим лекарством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, "эффективная доза" может быть рассмотрена в контексте введения одного или более чем одного терапевтического агента, и один агент может быть рассмотрен как вводимый в эффективном количестве, если в сочетании с одним или более чем одним другим агентом может быть достигнут желаемый результат.

"Индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающее, более предпочтительно человека. Млекопитающие также включают сельскохозяйственных животных, спортивных животных, питомцев, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и крыс, но не ограничены ими.

Использованный здесь "вектор" означает конструкцию, которая способна доставлять и предпочтительно экспрессировать один или более чем один интересующий ген или последовательность в клетке-хозяине. Примеры векторов включают вирусные векторы, голые ДНК или РНК экспрессирующие векторы, плазмиду, космиду или фаговые векторы, ДНК или РНК экспрессирующие векторы, ассоциированные с катионными конденсирующими агентами, ДНК или РНК экспрессирующие векторы, инкапсулированные в липосомах, и некоторые эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты, но не ограничены ими.

Используемая здесь "последовательность, контролирующая экспрессию" означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая направляет транскрипцию нуклеиновой кислоты. Последовательность, контролирующая экспрессию, может представлять собой промотор, такой как конститутивный или индуцибельный промотор, или энхансер. Последовательность, контролирующая экспрессию, функционально связана с транскрибируемой последовательностью нуклеиновой кислоты.

Используемый здесь "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемый эксципиент" включает любое вещество, которое при объединении с активным ингредиентом дает этому ингредиенту возможность сохранять биологическую активность и не является реактивным в отношении иммунной системы субъекта. Примеры включают любой из стандартных фармацевтических носителей, таких как забуференный фосфатом физиологический раствор, вода, эмульсии, такие как эмульсия масло/вода, и различные типы увлажнителей, но не ограничены ими. Предпочтительные разбавители для введения в аэрозоле или парентерального введения представляют собой забуференный фосфатом физиологический раствор или нормальный (0,9%) физиологический раствор. Композиции, содержащие такие носители, готовят хорошо известными общепринятыми способами (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; и Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000).

Предполагают, что используемый здесь термин " k_{on} " относится к константе скорости ассоциации антитела с антигеном.

Предполагают, что используемый здесь термин " k_{off} " относится к константе скорости диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген.

Предполагают, что используемый здесь термин " K_D " относится к равновесной константе диссоциации взаимодействия антитело-антиген.

Предполагают, что использованный здесь термин "вазомоторный симптом" относится к состояниям, связанным с расширением кровеносных сосудов, и включает головную боль (такую как мигрень и другие), прилив крови (или приступообразное ощущение жара), приливы, бессонницу, расстройства сна, расстройства настроения, раздражимость, чрезмерную потливость, ночную потливость, дневную потливость, утомление и т.п., вызванное в том числе терморегуляторной дисфункцией, но не ограничен ими.

Использованные здесь термины "прилив", "прилив крови" и "приступообразное ощущение жара" представляют собой известные в области техники термины, относящиеся к эпизодическому расстройству температуры тела, обычно состоящему из внезапного прилива крови к коже, обычно сопровождаемому потоотделением у субъекта.

А. Способы профилактики или лечения вазомоторных симптомов.

В одном из аспектов в изобретении предложен способ лечения или профилактики по меньшей мере одного вазомоторного симптома, такого как головная боль (например, мигрень) или приливы крови, у индивида, включающий введение указанному индивиду эффективного количества антагонистического антитела против CGRP или полипептидов, имеющих происхождение из данного антитела.

В еще одном аспекте в изобретении предложен способ уменьшения интенсивности, контроля, снижения частоты или сдерживания развития или прогрессирования по меньшей мере одного вазомоторного симптома, такого как головная боль (например, мигрень) или приливы крови, у индивида, включающий введение указанному индивиду эффективного количества антагонистического антитела против CGRP.

В еще одном аспекте в изобретении предложены способы уменьшения интенсивности, контроля, снижения частоты или сдерживания развития или прогрессирования головной боли (например, мигрени) у индивида, включающие введение указанному индивиду эффективного количества антагонистического антитела против CGRP в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным агентом, полезным для лечения головной боли.

Такие дополнительные агенты включают агонисты 5-НТ и NSAID, но не ограничены ими. Например, одновременно может быть введено антитело и по меньшей мере один дополнительный агент, т.е. они могут быть введены в достаточно близкие моменты времени для того, чтобы дать возможность перекрывания их индивидуальных терапевтических эффектов. Например, количество агониста 5-НТ или NSAID, вводимого в комбинации с антителом против CGRP, должно быть достаточным для снижения частоты рецидивов головной боли у пациентов или обеспечения более длительной эффективности по сравнению с введением любого из этих агентов в отсутствие другого. Этот способ может быть использован для лечения головных болей, относящихся к любому из широкого разнообразия классов, включая мигрень с аурой или без нее, гемиплегическую мигрень, кластерные головные боли, мигренозную невралгию, хронические головные боли, головные боли напряжения и головные боли, возникающие в результате других медицинских состояний (таких как инфекция или повышенное черепное давление из-за опухоли); хроническую пароксизмальную гемикранию; смешанную головную боль, не ассоциированную со структурным нарушением; головную боль, ассоциированную с несосудистым внутричерепным расстройством; головную боль, ассоциированную с введением вещества или синдромом его отмены; головную боль, ассоциированную с нецефалической инфекцией; головную боль, ассоциированную с метаболическим расстройством; головную боль, ассоциированную с заболеванием черепа, шеи, глаз, ушей, носа, носовых пазух, зубов, ротовой полости или другой лицевой или черепной структуры; черепные невралгии; и боль нервного ствола и деафферентационная боль.

Специалист в данной области техники способен определить подходящие дозы конкретных агентов, применяемых в комбинации с антителом против CGRP. Например, суматриптан может быть введен в дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 300 мг. При непарентеральном введении типичная доза суматриптана составляет от приблизительно 25 до приблизительно 100 мг, причем приблизительно 50 мг, как правило, является предпочтительной, и при парентеральном введении предпочтительная доза составляет приблизительно 6 мг. Тем не менее, эти дозы могут варьировать в соответствии со способами, стандартными в данной области техники, таким образом, что они оптимизированы для конкретного пациента или для конкретной комбинированной терапии. Дополнительно, например, цефекосиб может быть введен в количестве от 50 до 500 мг.

В еще одном аспекте в изобретении предложены способы уменьшения интенсивности, контроля, снижения частоты или сдерживания развития или прогрессирования приливов крови у индивида, включающие введение указанному индивиду эффективного количества антагонистического антитела против CGRP в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным агентом, полезным для лечения приливов крови. Такие дополнительные агенты включают гормональные способы лечения, включающие эстрогены и/или некоторые прогестины, но не ограничены ими.

В отношении всех описанных здесь способов ссылка на антагонистические антитела против CGRP также включает композиции, содержащие один или более чем один из этих агентов. Эти композиции дополнительно могут содержать подходящие эксципиенты, такие как фармацевтически приемлемые эксципиенты, включая буферы, которые хорошо известны в данной области техники. Настоящее изобретение может быть использовано самостоятельно или в комбинации с другими обычными способами лечения.

Антагонистическое антитело против CGRP может быть введено индивиду любым подходящим путем. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что описанные здесь примеры не предназначены ограничивать объем изобретения, а иллюстрируют доступные способы. Соответственно, в некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP вводят индивиду в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение, например в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение периода времени, путем внутримышечного, внутривнутрибрюшинного, внутриспинального, подкожного, интраартикулярного, подъязычного, внутрисуставного введения, путем инсультации, внутривнутрибрюшинного, перорального введения, путем ингаляции или местного путем. Введение может быть системным, например внутривенное введение, или локальным. Для введения полезны

имеющиеся в продаже распылители жидких препаратов, включая струйные распылители и ультразвуковые распылители. Жидкие препараты можно распылять непосредственно, и лиофилизированный порошок можно распылять после разведения. Альтернативно, антагонистическое антитело против CGRP можно распылять в виде аэрозоля с использованием фторуглеродного препарата и ингалятора с отмеренными дозами, или ингалировать в виде лиофилизированного и измельченного порошка.

В одном из воплощений антагонистическое антитело против CGRP вводят способами сайт-специфической или целевой локальной доставки. Примеры способов сайт-специфической или целевой локальной доставки включают различные имплантируемые депо-источники антагонистического антитела против CGRP или катетеры для локальной доставки, такие как катетеры для инфузии, постоянный катетер или игольчатый катетер, синтетические имплантаты, адвентициальные аппликаторы, шунты и стенты или другие имплантируемые устройства, сайт-специфические носители, прямую инъекцию или непосредственное применение. См., например, публикацию заявки PCT WO 00/53211 и патент США № 5981568.

Для введения могут быть использованы различные препараты антагонистического антитела против CGRP. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP может быть введено в чистом виде. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP и фармацевтически приемлемый эксципиент могут находиться в различных лекарственных формах. Фармацевтически приемлемые эксципиенты известны в данной области техники и представляют собой относительно инертные вещества, которые облегчают введение фармакологически эффективного вещества. Например, эксципиент может обеспечивать форму или консистенцию или действовать в качестве разбавителя. Подходящие эксципиенты включают стабилизаторы, увлажнители и эмульгаторы, соли для изменения осмолярности, инкапсулирующие агенты, буферы и усилители проницаемости кожи, но не ограничены ими. Эксципиенты, а также препараты для парентеральной и непарентеральной доставки лекарства приведены в Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

В некоторых воплощениях такие агенты готовят для введения путем инъекции (например, внутривенной, внутримышечной, подкожной, внутримышечной и т.п.). Соответственно, эти агенты можно объединять с фармацевтически приемлемыми разбавителями, такими как физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и т.п. Конкретная схема введения доз, т.е. доза, время введения и повторность, будет зависеть от конкретного индивида и истории болезни данного индивида.

Антитело против CGRP может быть введено с использованием любого подходящего способа, включая инъекцию (например, внутривенную, внутримышечную, подкожную, внутримышечную и т.п.). Антитела против CGRP также могут быть введены путем ингаляции, как здесь описано. Как правило, для введения антител против CGRP исходная предполагаемая доза может составлять приблизительно 2 мг/кг. Для задачи настоящего изобретения типичная суточная доза может находиться в диапазоне от 3 до 30 мкг/кг, до 300 мкг/кг, до 3 мг/кг, до 30 мг/кг, до 100 мг/кг или более в зависимости от вышеупомянутых факторов. Например, может быть использована доза приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг и приблизительно 25 мг/кг. Для повторных введений в течение нескольких суток или более длительного введения, в зависимости от состояния, лечение поддерживают до достижения желаемого подавления симптомов или до достижения достаточных терапевтических уровней, например для уменьшения боли. Пример схемы введения доз включает введение исходной дозы, составляющей приблизительно 2 мг/кг, с последующей еженедельной поддерживающей дозой приблизительно 1 мг/кг антитела против CGRP, или с последующей поддерживающей дозой приблизительно 1 мг/кг через неделю. Тем не менее, могут быть полезны другие схемы введения доз в зависимости от картины фармакокинетического разложения, которую практикующий врач желает достичь. Например, в некоторых воплощениях рассматривают дозу от одного до четырех раз в неделю. Ход такого способа лечения легко контролировать обычными методами и анализами. Схема введения дозы (включающая применяемый(е) антагонист(ы) CGRP) может варьировать в течение времени.

Для задачи настоящего изобретения подходящая доза антагонистического антитела против CGRP зависит от используемого антагонистического антитела против CGRP (или его композиции), типа и тяжести головной боли (например, мигрени), которую лечат, вводят ли агент для профилактических или терапевтических задач, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на агент и решения лечащего врача. Обычно клинический врач вводит антагонистическое антитело против CGRP до достижения дозы, которая позволит достичь желаемый результат. Доза и/или частота может варьировать в процессе лечения.

В определение дозы, как правило, вносят вклад эмпирические факторы, такие как период полувыведения. Например, для увеличения периода полувыведения антитела и для предотвращения атаки антител иммунной системой хозяина могут быть использованы антитела, которые совместимы с иммунной системой человека, такие как гуманизированные антитела или полностью человеческие антитела. Частота введения может быть определена и подобрана во время курса лечения и, как правило, но необязательно, основана на лечении, и/или подавлении, и/или уменьшении интенсивности, и/или сдерживания головной боли (например, мигрени). Альтернативно, могут быть подходящими препараты антагонистических антител против CGRP с длительным непрерывным высвобождением. В данной области техники

известны различные препараты и устройства для достижения длительного высвобождения.

В одном из воплощений дозы антагонистического антитела против CGRP могут быть определены эмпирически для индивидуумов, которым осуществляют одно или более чем одно введение антагонистического антитела против CGRP. Индивидуумам вводят увеличивающиеся дозы антитела против CGRP. Для оценки эффективности антагонистического антитела против CGRP можно руководствоваться индикатором заболевания.

Введение антагонистического антитела против CGRP в соответствии со способом по настоящему изобретению может быть непрерывным или периодическим в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, от того, является ли задача введения терапевтической или профилактической, и других факторов, известных практикующим врачам. Введение антагонистического антитела против CGRP может быть, по существу, непрерывным в течение заданного периода времени или может быть в виде серий разделенных по времени доз, например перед, во время или после развития головной боли (например, мигрени); перед; во время; перед и после; во время и после; перед и во время или перед, во время и после развития головной боли. Введение может быть перед, во время и/или после любого события, вероятно приводящего к головной боли.

В некоторых воплощениях может присутствовать более чем одно антагонистическое антитело против CGRP. Может присутствовать по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или более различных антагонистических антител против CGRP. Как правило, такие антагонистические антитела против CGRP могут иметь совместимые виды активности, которые не влияют отрицательно друг на друга. Антагонистическое антитело против CGRP также может быть использовано совместно с другими антагонистами CGRP или антагонистами рецептора CGRP. Например, может быть использован один или более чем один из следующих антагонистов CGRP: антисмысловая молекула, направленная на CGRP (включая антисмысловую молекулу, направленную на нуклеиновую кислоту, кодирующую CGRP), соединение-ингибитор CGRP, структурный аналог CGRP, доминантно-негативная мутация рецептора CGRP, связывающего CGRP, и антитело против рецептора CGRP. Антагонистическое антитело против CGRP также может быть использовано в сочетании с другими агентами, которые служат для усиления и/или дополнения эффективности агентов.

Терапевтические препараты антагонистического антитела против CGRP, используемые в соответствии с настоящим изобретением, готовят для хранения путем смешивания антитела, имеющего желательную степень чистоты, с возможными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20th Ed. Mack Publishing (2000)), в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и могут содержать буферы, такие как фосфатный, цитратный буфер и другие органические кислоты; соли, такие как хлорид натрия; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутил- или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и метакрезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (менее чем примерно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразователи, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG).

Липосомы, содержащие антагонистическое антитело против CGRP, готовят способами, известными в данной области техники, такими, как описано в Epstein, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980); и патентах США №№ 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем нахождения в системе кровообращения раскрыты в патенте США № 5013556. Особенно полезные липосомы могут быть приготовлены способом обращенно-фазового выпаривания липидной композиции, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и PEG-производное фосфатидилэтаноламина (PEG-PE). Липосомы экструдуют через фильтры с определенными размерами пор для получения липосом с желаемым диаметром.

Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, способами коацервации или полимеризации на границе раздела фаз, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатиновые микрокапсулы и микрокапсулы из поли-(метилметакрилата), соответственно, в коллоидных системах доставки лекарства (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсиях.

Такие способы описаны в Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20th Ed. Mack Publishing (2000).

Могут быть приготовлены препараты с длительным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с длительным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных

полимеров, содержащих антители, где матрицы находятся в виде оформленных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с длительным высвобождением включают полиэферы, гидрогели (например, поли-(2-гидроксиэтил-метакрилат) или поливиниловый спирт, полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и 7-этил-L-глутамата, нераспадаемый этиленвинилацетат, распадаемые сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот, и лейпролида ацетата), изобутирата ацетата сахарозы и поли-D-(-)-3-гидроксипропионовая кислота.

Препараты, предназначенные для применения для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко осуществить, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Терапевтические композиции антагонистического антитела против CGRP, как правило, помещают в контейнер, имеющий стерильное отверстие для доступа, например контейнер для внутривенного раствора или пузырек, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции.

Композиции по настоящему изобретению могут находиться в стандартных лекарственных формах, таких как таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, растворы или суспензии, или суппозитории для перорального, парентерального или ректального введения или введения путем ингаляции или инсуффляции.

Для приготовления твердых композиций, таких как таблетки, действующее начало смешивают с фармацевтическим носителем, например общепринятыми ингредиентами для таблетирования, такими как кукурузный крахмал, лактоза, сахароза, сорбит, тальк, стеариновая кислота, стеарат магния, дикальцийфосфат или смолы, и другими фармацевтическими разбавителями, например водой, с получением твердой композиции предварительного препарата, содержащей гомогенную смесь соединения по настоящему изобретению или ее нетоксичную фармацевтически приемлемую соль. Ссылка на такие композиции предварительных препаратов, как на гомогенные, означает, что активный ингредиент равномерно диспергирован по всей композиции таким образом, что композиция может быть легко разделена на равные эффективные стандартные лекарственные формы, такие как таблетки, пилюли и капсулы. Такую твердую композицию предварительного препарата затем делят на лекарственные формы описанного выше типа, содержащие от 0,1 до примерно 500 мг активного ингредиента по настоящему изобретению. Таблетки или пилюли новой композиции могут быть покрыты или приготовлены каким-либо иным способом с получением лекарственной формы, обеспечивающей преимущество длительного действия. Например, таблетка или пилюля может содержать внутренний компонент дозы и внешний компонент дозы, причем последний компонент представлен в форме оболочки поверх первого компонента. Два компонента могут быть разделены энтеросолюбильным слоем, который служит для обеспечения устойчивости к разложению в желудке и позволяет внутреннему компоненту пройти интактным в двенадцатиперстную кишку, или для задержки его высвобождения. Для таких энтеросолюбильных слоев или оболочек может быть использовано множество материалов, включая множество полимерных кислот и смесей полимерных кислот с такими веществами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

Подходящие поверхностно-активные агенты включают, в частности, неионные агенты, такие как полиоксиэтиленсорбитаны (например, Tween™ 20, 40, 60, 80 или 85) и другие сорбитаны (например, Span™ 20, 40, 60, 80 или 85). Композиции с поверхностно-активным агентом обычно содержат от 0,05 до 5% поверхностно-активного агента и могут содержать от 0,1 до 2,5%. Понятно, что при необходимости могут быть добавлены другие ингредиенты, например маннит или другие фармацевтически приемлемые разбавители.

Подходящие эмульсии могут быть приготовлены с использованием имеющихся в продаже жировых эмульсий, таких как Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ и Lipiphysan™. Активный ингредиент может быть либо растворен в предварительно смешанной эмульсионной композиции, или, альтернативно, он может быть растворен в масле (например, соевом масле, сафлоровом масле, хлопковом масле, кунжутном масле, кукурузном масле или миндальном масле) и эмульсии, образованной при смешивании с фосфолипидом (например, яичными фосфолипидами, соевыми фосфолипидами или соевым лецитином) и водой. Понятно, что могут быть добавлены другие ингредиенты, например глицерин или глюкоза, для регулировки тоничности эмульсии. Подходящие эмульсии, как правило, содержат до 20% масла, например от 5 до 20%. Жировая эмульсия может содержать капли жира от 0,1 до 1,0 мкм, в частности от 0,1 до 0,5 мкм, и иметь pH в диапазоне от 5,5 до 8,0.

Эмульсионные композиции могут представлять собой композиции, приготовленные путем смешивания антагонистического антитела против CGRP с Intralipid™ или его компонентами (соевым маслом, яичными фосфолипидами, глицерином и водой).

Композиции для ингаляции или инсуффляции включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях или их смеси и порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты, как описано выше. В некоторых воплощениях композиции вводят пероральным или назальным респираторным путем для получения локального или системного эффекта. Композиции в предпочтительно стерильных фармацевтически приемлемых растворителях можно распылять с использованием газов. Распыляемые раство-

ры можно вдыхать непосредственно из распылителя, или распылитель может быть прикреплен к маске, палатке или дыхательному аппарату пульсирующего положительного давления. Композиции в виде раствора, суспензии или порошка могут быть введены предпочтительно перорально или назально из устройств, которые доставляют лекарственную форму подходящим образом.

Диагностика или оценка головной боли хорошо известна в данной области техники. Оценка может быть осуществлена на основе субъективных измерений, таких как характеристика симптомов пациентом. Например, мигрень можно диагностировать на основе следующих критериев: 1) эпизодические приступы головной боли, длящиеся от 4 до 72 ч; 2) по двум из следующих симптомов: односторонняя боль, пульсирующая боль, аггравация при движении и боль умеренной или сильной интенсивности; и 3) одному из следующих симптомов: тошнота или рвота, и фотофобия или фонофобия. Goadsby et al., *N. Engl. J. Med.* 346:257-270, 2002.

Эффективность лечения может быть оценена с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Например, может оцениваться купирование боли. Соответственно, в некоторых воплощениях купирование боли субъективно обнаруживают после 1,2 или нескольких часов после введения антитела против CGRP. В некоторых воплощениях частоту приступов головной боли субъективно обнаруживают после введения антитела против CGRP.

Б. Антагонистические антитела против CGRP.

В способах по изобретению применяют антагонистическое антитело против CGRP, которое относится к любой молекуле антитела, блокирующей, подавляющей или уменьшающей (в том числе существенно) биологическую активность CGRP, включая последующие сигнальные пути, опосредованные CGRP, такие как связывание рецептора и/или индуцирование клеточного ответа на CGRP.

Антагонистическое антитело против CGRP должно демонстрировать любую одну или более чем одну из следующих характеристик: (а) связывание с CGRP; (б) блокирование связывания CGRP с его рецептором(ами); (в) блокирование или уменьшение активации рецептора CGRP (включая активацию сAMP); (г) ингибирование биологической активности CGRP или последующих путей, опосредованных сигнальной функцией CGRP; (д) профилактика, уменьшение интенсивности или лечение любого вида головной боли (например, мигрени); (е) увеличение клиренса CGRP и (ж) ингибирование (снижение) синтеза, продукции или высвобождения CGRP. Антагонистические антитела против CGRP известны в данной области техники. См., например, Tan et al., *Clin. Sci. (Lond.)* 89:565-73, 1995; Sigma (Missouri, US), продукт № C7113 (клон #4901); Plourde et al., *Peptides* 14:1225-1229, 1993.

Для задач изобретения антитело взаимодействует с CGRP таким образом, чтобы ингибировать CGRP и/или последующие пути, опосредованные сигнальной функцией CGRP. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP распознает человеческий CGRP. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP связывается с человеческим α -CGRP и β -CGRP. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP связывает человеческий и крысиный CGRP. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP связывает С-концевой фрагмент, имеющий аминокислоты 25-37 CGRP. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP связывает С-концевой эпитоп по аминокислотам 25-37 CGRP.

Антитела, полезные по настоящему изобретению, могут охватывать моноклональные антитела, поликлональные антитела, фрагменты антитела (например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc и т.д.), химерные антитела, биспецифические антитела, гетероконъюгированные антитела, одноцепочечные (ScFv) их мутанты, слитые белки, включающие фрагмент антитела (например, доменное антитело), гуманизированные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, содержащую сайт распознавания антигена, имеющий требуемую специфичность, включающий варианты гликозилирования антител, варианты антител по аминокислотной последовательности и ковалентно модифицированные антитела. Антитела могут быть мышиными, крысиными, человеческими или имеющими любое другое происхождение (включая химерные или гуманизированные антитела).

В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP представляет собой моноклональное антитело. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP является гуманизированным. В некоторых воплощениях антитело является человеческим. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP представляет собой антитело G1 (как здесь описано). В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP содержит один или более чем один CDR (например, один, два, три, четыре, пять или в некоторых воплощениях все шесть CDR) антитела G1 или варианты G1, представленные в табл. 6. В других воплощениях антагонистическое антитело против CGRP содержит аминокислотную последовательность вариательной области тяжелой цепи, представленной на фиг. 5 (SEQ ID NO: 1), и аминокислотную последовательность вариательной области легкой цепи, представленной на фиг. 5 (SEQ ID NO: 2).

В некоторых воплощениях антитело содержит модифицированную константную область, такую как описанная здесь константная область, которая является иммунологически инертной. В некоторых воплощениях константная область модифицирована, как описано в *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624; заявке РСТ № РСТ/GB 99/01441; и/или заявке на патент Великобритании № 9809951.8. В других воплощениях антитело содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG2, включающую сле-

дующие мутации: A330P331 на S330S331 (нумерация аминокислот со ссылкой на последовательность IgG2 дикого типа) Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624. В некоторых воплощениях антитело содержит константную область IgG4, включающую следующие мутации: E233F234L235 на P233V234A235. В других воплощениях константная область агликозилирована для N-гликозилирования. В некоторых воплощениях константная область агликозилирована для N-гликозилирования путем мутации остатка присоединения олигосахарида (такого как Asn297) и/или фланкирующих остатков, которые представляют собой часть последовательности, распознающей N-гликозилирование, в константной области. В некоторых воплощениях константная область агликозилирована для N-гликозилирования. Константная область может быть агликозилирована для N-гликозилирования ферментативно или путем экспрессии в клетке-хозяине, дефицитном по гликозилированию.

Аффинность связывания (K_D) антагонистического антитела против CGRP в отношении CGRP (такого как человеческий α -CGRP) может составлять от приблизительно 0,02 до приблизительно 200 нМ. В некоторых воплощениях аффинность связывания представляет собой любую из приблизительно 200, приблизительно 100, приблизительно 50, приблизительно 10, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500, приблизительно 100, приблизительно 60, приблизительно 40, приблизительно 20, приблизительно 15, приблизительно 10, приблизительно 5 или приблизительно 2 пМ. В некоторых воплощениях аффинность связывания составляет менее чем любое значение из приблизительно 250, приблизительно 200, приблизительно 100, приблизительно 50, приблизительно 10, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500, приблизительно 100 или приблизительно 50 пМ.

Один из путей определения аффинности связывания антитела с CGRP заключается в измерении аффинности связывания монофункциональных фрагментов Fab антитела. Для получения монофункциональных фрагментов Fab антитела (например IgG) можно расщеплять папаином или рекомбинантно экспрессировать. Аффинность Fab фрагмента антитела против CGRP может быть определена посредством поверхностного плазмонного резонанса (система поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore3000™, Biacore, INC, Piscataway NJ), оборудованного сенсорными чипами с предварительно иммобилизованным стрептавидином (SA) с использованием буфера для анализа HBS-EP (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% об./об. поверхностно-активного вещества P20). Биотинилированный человеческий CGRP (или любой другой CGRP) можно развести в буфере HBS-EP до концентрации менее чем 0,5 мкг/мл и ввести в каналы отдельного чипа, используя различные периоды времени контакта, с достижением двух диапазонов плотности антигена, либо 50-200 единиц реакции (RU) для подробных кинетических исследований, либо 800-1000 RU для скрининговых анализов. Исследования регенерации продемонстрировали, что 25 mM NaOH в 25% об./об. этаноле эффективно удаляет связанный Fab, в то же время сохраняя активность CGRP на чипе в течение более 200 инъекций. Типично, серийные разведения (охватывающие концентрации 0,1-10x относительно оцененной K_D) очищенных образцов Fab вводят в течение 1 мин со скоростью 100 мкл/мин и дают возможность для диссоциации в течение до 2 ч. Концентрацию белков Fab определяют путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) и/или электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) с использованием известной концентрации Fab (определенной в соответствии с аминокислотным анализом) в качестве стандарта. Кинетические скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) определяют одновременно путем подгонки данных в целом к модели связывания Лэнгмюра 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) с использованием программы BIAevaluation. Величины равновесной константы диссоциации (K_D) рассчитывают как k_{off}/k_{on} . Этот протокол подходит для использования при определении аффинности связывания антитела с любым CGRP, включая человеческий CGRP, CGRP другого млекопитающего (такой как мышинный CGRP, крысиный CGRP, CGRP примата), а также различные формы CGRP (такие как форма α и β). Аффинность связывания антитела, как правило, измеряют при 25°C, но также ее можно измерять при 37°C.

Антагонистические антитела против CGRP могут быть получены любым способом, известным в данной области техники. Путь и схему иммунизации животного-хозяина, как правило, выбирают в соответствии с установленными и общепризнанными способами стимуляции и продукции антитела, как здесь дополнительно описано. Общие способы продукции человеческих и мышинных антител хорошо известны в данной области техники и описаны здесь.

Понятно, что любой субъект-млекопитающее, включая людей или их клетки, продуцирующие антитело, может быть подвергнуто манипуляции для того, чтобы служить в качестве основы для продукции гибридных клеточных линий млекопитающего, включая человека. Типично, животное-хозяин инокулируют внутрибрюшинно, внутримышечно, перорально, подкожно, внутривенно и/или внутрисуставно количеством иммуногена, в том числе, как описано здесь.

Гибридомы могут быть получены из лимфоцитов и иммортализованных клеток миеломы с использованием общего способа гибридизации соматических клеток Kohler, B. and Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497 или модифицированного Buck, D.W., et al., *In Vitro*, 18:377-381 (1982). При гибридизации могут быть использованы имеющиеся линии миеломы, включая X63-Ag8.653 и линии из Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA, но не ограниченные ими. Как правило, способ включает

слияние клеток миеломы и лимфоидных клеток с использованием вещества, способствующего слиянию клеток, такого как полиэтиленгликоль, или электрическими средствами, хорошо известными специалисту в данной области техники. После слияния клетки отделяют от среды для слияния и выращивают в селективной среде для роста, такой как гипоксантин-аминоптерин-тимидиновая (HAT) среда для удаления негибридизированных родительских клеток. Любые описанные здесь среды, дополненные сывороткой или без нее, могут быть использованы для культивирования гибридом, секретирующих моноклональные антитела. В качестве еще одной альтернативы способа слияния клеток для продукции моноклональных антител против CGRP по настоящему изобретению могут быть использованы EBV immortalized B-клетки. При желании гибридомы размножают и субклонируют и супернатанты исследуют в отношении активности против иммуногена общепринятыми способами иммуноанализа (например, радиоиммуноанализ, иммуноферментный анализ или флуоресцентный иммуноанализ).

Гибридомы, которые могут быть использованы в качестве источника антител, охватывают все производные, клетки-предшественники родительских гибридом, которые продуцируют моноклональное антитело, специфичные в отношении CGRP, или их фрагмент.

Гибридомы, которые продуцируют такие антитела, могут быть выращены *in vitro* или *in vivo* с использованием известных способов. При желании моноклональные антитела могут быть выделены из культуральных сред или жидкостей организма общепринятыми способами очистки иммуноглобулина, такими как осаждение сульфатом аммония, гель-электрофорез, диализ, хроматография и ультрафильтрация. Если присутствует нежелательная активность, она может быть удалена, например, путем пропускания препарата над адсорбентами, приготовленными из иммуногена, прикрепленного к твердой фазе, и элюции или высвобождения желаемых антител с этого иммуногена. Иммунизация животного-хозяина человеческим CGRP или фрагментом, содержащим аминокислотную последовательность-мишень, конъюгированную с белком, который является иммуногенным для иммунизированных видов, например гемоцианином лимфы улитки, сывороточным альбумином, бычьим тироглобулином или соевым ингибитором трипсина, с использованием бифункционального или дериватирующего агента, например малеимидобензоил-сульфосукцинимидного эфира (конъюгация через цистеиновые остатки), N-гидроксисукцинимид (через лизиновые остатки), глутарового альдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 или $\text{RN}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R1 представляют собой различные алкильные группы, может дать популяцию антитела (например, моноклонального антитела).

При желании интересующее антагонистическое антитело против CGRP (моноклональное или поликлональное) может быть секвенировано, и полинуклеотидная последовательность затем может быть клонирована в вектор для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующая интересующее антитело, может поддерживаться в векторе в клетке-хозяине, и клетка-хозяин затем может быть выращена и заморожена для последующего применения. Альтернативно, полинуклеотидная последовательность может быть использована для генетической манипуляции для "гуманизации" антитела или для улучшения аффинности или других характеристических антител. Например, константная область может быть сконструирована таким образом, чтобы иметь большее сходство с константными областями человеческого антитела для того, чтобы избежать иммунного ответа, когда антитело применяют в клинических испытаниях и способах лечения людей. Может быть желательно генетически манипулировать с последовательностью антитела для достижения большей аффинности в отношении CGRP и большей эффективности в ингибировании CGRP. Специалисту в данной области техники понятно, что в антагонистическом антителе против CGRP могут быть осуществлены изменения одного или более чем одного полинуклеотида с сохранением его способности связывания с CGRP.

Существуют четыре общие стадии гуманизации моноклонального антитела. Эти стадии представляют собой: (1) определение нуклеотида и предполагаемой аминокислотной последовательности вариабельного домена легкой и тяжелой цепи исходного антитела, (2) конструирование гуманизированного антитела, т.е. определение того, какую каркасную область антитела использовать в способе гуманизации, (3) действительные способы/методы гуманизации, и (4) трансфекция и экспрессия гуманизированного антитела. См., например, патенты США №№ 4816567; 5807715; 5866692; 6331415; 5530101; 5693761; 5693762; 5585089 и 6180370.

Описано множество молекул "гуманизированного" антитела, включающих антигенсвязывающий сайт, имеющий происхождение из иммуноглобулина, не являющегося человеческим, включая химерные антитела, имеющие V-области или модифицированные V-области антител грызунов и их ассоциированные гипервариабельные участки (CDR), слитые с константными доменами человеческого антитела. См., например, Winter et al. *Nature* 349:293-299 (1991), Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. *J. Immunol.* 138:4534-4538 (1987) и Brown et al. *Cancer Res.* 47:3577-3583 (1987). В других ссылках описаны CDR грызунов, перенесенные в поддерживающую каркасную область (FR) человеческого антитела перед слиянием с подходящим константным доменом человеческого антитела. См., например, Riechmann et al. *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeven et al. *Science* 239:1534-1536 (1988) и Jones et al. *Nature* 321:522-525 (1986). В другой ссылке описаны CDR грызунов, поддерживаемые рекомбинантно покрытыми каркасными областями антител грызунов. См., например, публикацию европейской заявки на патент № 0519596. Эти "гуманизированные" молекулы сконструированы для минимизации

ции нежелательного иммунологического ответа в отношении молекул антител грызунов против человеческого антитела, которые ограничивают длительность и эффективность терапевтических применений этих группировок в отношении реципиентов-людей. Например, константная область антитела может быть сконструирована таким образом, чтобы быть иммунологически инертной (например, она не запускает лизис комплемента). См., например, публикацию PCT № PCT/GB 99/01441; заявку на патент Великобритании № 9809951.8. Другие способы гуманизации антител, которые могут также быть использованы, раскрыты в Daugherty et al., Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 (1991) и в патентах США №№ 6180377; 6054297; 5997867; 5866692; 6210671 и 6350861 и в публикации PCT № WO 01/27160.

В еще одной альтернативе полностью человеческие антитела могут быть получены с использованием имеющихся в продаже мышей, которые сконструированы для экспрессии специфических белков человеческих иммуноглобулинов. Трансгенные животные, которые сконструированы для продукции более желательного (например, полностью человеческие антитела) или более устойчивого иммунного ответа, также могут быть использованы для конструирования гуманизированных или человеческих антител. Примеры такого способа представляют собой Xenomouse™ из Abgenix, Inc. (Fremont, CA) и HuMAb-Mouse® и TC Mouse™ из Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

Альтернативно, антитела могут быть получены рекомбинантным путем и экспрессированы с использованием любого способа, известного в данной области техники. В еще одной альтернативе антитела могут быть получены рекомбинантным путем с использованием технологии фагового дисплея. См., например, патенты США №№ 5565332; 5580717; 5733743 и 6265150 и Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994). Альтернативно, технология фагового дисплея (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) может быть использована для получения человеческих антител и фрагментов антител *in vitro* из наборов генов варибельного (V) домена иммуноглобулина неиммунизированных доноров. В соответствии с этим способом гены V-домена антитела клонированы внутри рамки в ген основного или минорного белка оболочки нитевидного бактериофага, такого как M13 или fd, и представлены как функциональные фрагменты антитела на поверхности фаговой частицы. Поскольку эта нитевидная частица содержит одноцепочечную копию ДНК фагового генома, отбор, основанный на функциональных свойствах антител, также приводит в результате к отбору гена, кодирующего антитело, проявляющее эти свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые из свойств В-клетки. Фаговый дисплей может быть проведен во множестве форматов; обзор см., например, в Johnson, Kevin S. and Chisweli, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Несколько источников сегментов V-генов могут быть использованы для фагового дисплея. Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) выделил разнообразный ряд антител против оксазолана из небольшой, полученной путем случайной комбинации библиотеки V-генов, происходящей из селезенок иммунизированных мышей. Может быть сконструирован набор V-генов неиммунизированных доноров-людей, и антитела на разнообразный ряд антигенов (включая аутоантиген) могут быть выделены, по существу, в соответствии со способами, описанными в Mark et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), или Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). При естественном иммунном ответе гены антитела аккумулируют мутации с высокой степенью (соматическая гипермутация). Некоторые из введенных изменений приводят к более высокой аффинности, и В-клетки, представляющие высокоаффинный поверхностный иммуноглобулин, предпочтительно реплицируются и дифференцируются при последующей антигенной стимуляции. Этот естественный процесс может быть имитирован путем использования способа, известного как "перетасовка цепей" (Marks, et al., Bio/Technol. 10:779-783 (1992)). В этом способе аффинность "первичных" человеческих антител, полученных при помощи фагового дисплея, может быть улучшена путем последовательного замещения генов V-областей тяжелой и легкой цепи наборами встречающихся в природе вариантов (наборы) генов V-домена, полученных от неиммунизированных доноров. Этот способ дает возможность для продукции антител и фрагментов антител, имеющих аффинности в диапазоне пМ-нМ. Стратегия получения очень крупных фаговых наборов антител (также известных как "мать всех библиотек" (the mother-of-all libraries)) описана в Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21:2265-2266 (1993). Перетасовка генов также может быть использована для получения человеческих антител из антител грызунов, где человеческое антитело имеет аффинности и специфичности, подобные исходному антителу грызуна. В соответствии с этим способом, который также называют как "эпитопный импринтинг", ген V-домена тяжелой или легкой цепи антител грызуна, полученных способом фагового дисплея, заменяют набором человеческих генов V-домена, с получением химер грызун-человек. Отбор антигена приводит в результате к выделению варибельных областей человеческого антитела, способных восстанавливать функциональный антигенсвязывающий сайт, т.е. эпитоп направляет выбором партнера ("делает отпечаток"). При повторении способа для замены оставшегося V-домена грызуна получают человеческое антитело (см. заявку PCT № WO 93/06213, опубликованную 1 апреля 1993 г.). В отличие от традиционной гуманизации антител грызунов путем переноса CDR в этом способе предложены полностью человеческие антитела, у которых отсутствуют остатки каркасной области или CDR грызунов.

Понятно, что хотя вышеприведенное обсуждение относится к гуманизированным антителам, общие обсуждаемые принципы применимы для получения антител для применения, например, у собак, кошек, приматов, лошадей и коров. Кроме того, понятно, что один или более чем один описанный здесь аспект

гуманизации антитела можно объединить, например перенос CDR, мутацию каркасной области и мутацию CDR.

Антитела могут быть получены рекомбинантным путем сначала путем выделения антител и клеток, продуцирующих антитело, у животных-хозяев, получения последовательности гена и с использованием последовательности гена рекомбинантной экспрессии антитела в клетках-хозяевах (например, клетках яичников китайского хомячка (CHO)). Другой способ, который может быть использован, заключается в экспрессии последовательности антитела в растениях (например, табаке) или трансгенном молоке. Способы рекомбинантной экспрессии антител в растениях или молоке были раскрыты. См., например, Peeters et al. *Vaccine* 19:2756 (2001); Lonberg N. and D. Huszar *Int.Rev.Immunol* 13:65 (1995); и Pollock, et al., *J. Immunol. Methods* 231:147(1999). Способы получения производных антител, например гуманизованных антител, одноцепочечных и т.д., известны в данной области техники.

Иммуноанализы и способы сортировки путем проточной цитометрии, такие как клеточная сортировка с флуоресцентной активацией (FACS), также могут быть использованы для выделения антител, специфичных в отношении CGRP.

Антитела могут быть связаны со множеством различных носителей. Носители могут быть активными и/или инертными. Примеры хорошо известных носителей включают полипропилен, полистирол, полиэтилен, декстран, нейлон, амилазы, стекло, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, агарозы и магнетит. Носитель может быть растворимым или нерастворимым в зависимости от задач изобретения. Специалисту в данной области техники известны другие подходящие носители для связывания антител, или он способен оценить такие носители с использованием стандартных экспериментов. В некоторых воплощениях носитель содержит группировку, которая нацелена на миокард.

ДНК, кодирующую моноклональные антитела, легко выделяют и секвенируют с использованием обычных способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи моноклональных антител). Клетки гибридомы служат в качестве предпочтительного источника такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессирующие векторы (такие как экспрессирующие векторы, раскрытые в публикации заявки РСТ № WO 87/04462), которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые не продуцируют иначе белок иммуноглобулин, с достижением синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. См., например, публикацию заявки РСТ № WO 87/04462. ДНК также может быть модифицирована, например, путем замещения кодирующей последовательности на константные домены человеческой тяжелой и легкой цепи вместо гомологичных мышинных последовательностей, Morrison et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851 (1984), или путем ковалентного присоединения к последовательности, кодирующей иммуноглобулин, всей или части кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида. Таким образом, получают "химерные" или "гибридные" антитела, которые здесь обладают специфичностью связывания моноклонального антитела против CGRP.

Антагонистические антитела против CGRP и полипептиды, имеющие происхождение из антител, могут быть идентифицированы или охарактеризованы с использованием способов, известных в данной области техники, посредством чего обнаруживают и/или измеряют сокращение, уменьшение интенсивности или нейтрализацию биологической активности CGRP. Например, антагонистическое антитело против CGRP также может быть идентифицировано путем инкубации агента-кандидата с CGRP и обнаружения любой одной или более чем одной из следующих характеристик: (а) связывание с CGRP; (б) блокирование связывания CGRP с его рецептором(ами); (в) блокирование или уменьшение активации рецептора CGRP (включая активацию cAMP); (г) ингибирование биологической активности CGRP или последующих путей, опосредованных сигнальной функцией CGRP; (д) профилактика, уменьшение интенсивности или лечение любого вида головной боли (например, мигрени); (е) увеличение клиренса CGRP и (ж) ингибирование (уменьшение) синтеза, продукции или высвобождения CGRP. В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP или полипептид идентифицируют путем инкубации агента-кандидата с CGRP и обнаружения связывания и/или сопутствующего уменьшения или нейтрализации биологической активности CGRP. Анализ связывания может быть осуществлен с очищенным(и) полипептидом(ами) CGRP или с клетками, экспрессирующими в природе, или трансфицированными для экспрессии полипептида(ов) CGRP. В одном из воплощений анализ связывания представляет собой конкурентный анализ связывания, в котором оценивают способность антитела-кандидата конкурировать с известным антагонистом против CGRP за связывание с CGRP. Анализ может быть проведен в различных форматах, включая формат ELISA. В других воплощениях антагонистическое антитело против CGRP идентифицируют путем инкубации агента-кандидата с CGRP и обнаружения связывания и сопутствующего ингибирования активации рецептора CGRP, экспрессируемого на поверхности клетки.

После исходной идентификации активность антагонистического антитела-кандидата против CGRP может быть дополнительно подтверждена и оптимизирована при помощи биоанализов, известных для тестирования целевых биологических активностей. Альтернативно, биоанализы могут быть использованы для непосредственного скрининга кандидатов. Например, CGRP стимулирует ряд измеряемых изменений в реагирующих клетках. Эти изменения включают стимуляцию с AMP в клетке (например, клетки

SK-N-MC), но не ограничены ими. Антагонистическая активность также может быть измерена с использованием животных моделей, таких как измерение расширения кровеносных сосудов кожи, вызванного стимуляцией подкожного нерва крысы. Escort et al., Br. J. Pharmacol. 110: 772-776, 1993. Животные модели головных болей (таких как мигрень) дополнительно могут быть использованы для тестирования эффективности антагонистических антител или полипептидов. Reuter, et al., Functional Neurology (15) Suppl. 3, 2000. Некоторые из способов идентификации и характеристики антагонистического антитела против CGRP или полипептида подробно описаны в примерах.

Антагонистические антитела против CGRP могут быть охарактеризованы с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Например, один из способов заключается в идентификации эпитопа, по которому осуществляется связывание, или "эпитопное картирование". Существует множество известных в данной области техники способов для картирования и характеристики расположения эпитопов на белках, включающих распознавание кристаллической структуры комплекса антитело-антиген, конкурентные анализы, анализы экспрессии генных фрагментов и анализы, основанные на синтетических пептидах, описанные, например, в Chapter 11 of Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. В дополнительном примере картирование эпитопа может быть использовано для определения последовательности, с которой связывается антагонистическое антитело против CGRP. Картирование эпитопа имеется в продаже от различных источников, например Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands). Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, т.е. содержащийся в единичной цепи аминокислот, или конформационный эпитоп, образованный трехмерным взаимодействием аминокислот, которые не обязательно могут располагаться в одной цепи. Могут быть выделены или синтезированы (например, рекомбинантным путем) пептиды, имеющие различную длину (например, длину по меньшей мере в 4-6 аминокислот), и использованы для анализов связывания с антагонистическим антителом против CGRP. В еще одном примере эпитоп, с которым связывается антагонистическое антитело против CGRP, может быть определен в систематическом скрининге с использованием перекрывающихся пептидов, имеющих происхождение из последовательности CGRP, и определении связывания с антагонистическим антителом против CGRP. В соответствии с анализами экспрессии генного фрагмента открытую рамку считывания, кодирующую CGRP, фрагментируют либо случайным образом, либо посредством специфических генетических конструкций и определяют реактивность экспрессированных фрагментов CGRP с тестируемым антителом. Генные фрагменты, например, могут быть получены путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) и затем транскрибированы и транслированы в белок *in vitro* в присутствии радиоактивных аминокислот. Связывание антител с фрагментами CGRP, мечеными радиоактивными изотопами, затем определяют путем иммунопреципитации и гель-электрофореза. Некоторые эпитопы также могут быть идентифицированы с использованием крупных библиотек случайных пептидных последовательностей, представленных на поверхности фаговых частиц (фаговых библиотек). Альтернативно, определенная библиотека перекрывающихся пептидных фрагментов может быть протестирована в отношении связывания с тестируемым антителом в простых анализах связывания. В дополнительном примере мутагенез антигенсвязывающего домена, эксперименты с обменом доменами и сканирующий аланином мутагенез могут быть осуществлены для идентификации остатков, требуемых, достаточных и/или необходимых для связывания с эпитопом. Например, эксперименты с обменом доменами могут быть осуществлены с использованием мутантного CGRP, в котором различные фрагменты полипептида CGRP замещены (обмен) последовательностями близкородственного, но антигенно отличающегося белка (такого как еще один член семейства белков нейротрофина). Путем оценки связывания антитела с мутантным CGRP можно оценить важность конкретного фрагмента CGRP для связывания антитела.

В еще одном способе, который может быть использован для характеристики антагонистического антитела против CGRP, конкурентные анализы применяют с другими антителами, которые, как известно, связываются с тем же самым антигеном, т.е. различными фрагментами на CGRP, определяют связывается ли антагонистическое антитело против CGRP с тем же самым эпитопом, как другие антитела. Конкурентные анализы хорошо известны специалистам в данной области техники.

Экспрессирующий вектор может быть использован для прямой экспрессии антагонистического антитела против CGRP. Специалисту в данной области техники известно введение экспрессирующих векторов для достижения экспрессии экзогенного белка *in vivo*. См., например, патенты США №№ 6436908; 6413942 и 6376471. Введение экспрессирующих векторов включает местное или системное введение, включая инъекцию, пероральное введение, пушку для частиц или введение через катетер, и местное введение. В еще одном воплощении экспрессирующий вектор вводят непосредственно в симпатический ствол или ганглии или в коронарную артерию, предсердие, желудочек или перикард.

Также можно использовать нацеленную доставку терапевтических композиций, содержащих экспрессирующий вектор или субгеномные полинуклеотиды. Опосредованные рецептором способы доставки ДНК описаны, например, в Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods and Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Терапевтические композиции, содержащие полинуклео-

тид, вводят в диапазоне от приблизительно 100 нг до приблизительно 200 мг ДНК для местного введения в протоколе генной терапии. Также в протоколе генной терапии могут быть использованы диапазоны концентрации ДНК, составляющие от приблизительно 500 нг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 2 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 500 мкг и от приблизительно 20 г до приблизительно 100 мкг ДНК. Терапевтические полинуклеотиды и полипептиды могут быть доставлены с использованием разбавителей для генной доставки. Разбавитель для генной доставки может иметь вирусное или невирусное происхождение (см. в общем Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1994) 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy* (1994) 5:845; Connolly, *Human Gene Therapy* (1995) 1:185; и Kaplitt, *Nature Genetics* (1994) 6:148). Экспрессия таких кодирующих последовательностей может быть индуцирована с использованием эндогенных промоторов млекопитающего или гетерологичных промоторов. Экспрессия кодирующей последовательности может быть конститутивной или контролируемой.

Вирусные векторы для доставки желаемого полинуклеотида и экспрессии в желаемой клетке хорошо известны в данной области техники. Примеры вирусных носителей включают рекомбинантные ретровирусы (см., например, публикации заявок PCT №№ WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; патенты США №№ 5219740 и 4777127; патент GB № 2200651 и европейский патент № 0345242), векторы, основанные на альфавирусах (например, векторы на основе вируса синдбис, вирусе лихорадки леса Семлики (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), вирусе Росс-Ривер (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) и вирусе венесуэльского энцефалита лошадей (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532)), и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (см., например, публикации заявок PCT №№ WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 и WO 95/00655), но не ограничены ими. Также может быть использовано введение ДНК, связанной с убитым аденовирусом, как описано в Curjel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3:147.

Также могут быть использованы невирусные носители для доставки и способы, включающие поликатионную конденсированную ДНК, связанную или несвязанную с убитым аденовирусом (см., например, Curjel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3:147); связанную с лигандом ДНК (см., например, Wu, *J. Biol. Chem.* (1989) 264:16985); клетки-носители для доставки в эукариотическую клетку (см., например, патент США № 5814482; публикации заявок PCT №№ WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763 и WO 97/42338) и нейтрализацию ядерного заряда или слияние с клеточными мембранами, но не ограничены ими. Также могут быть использованы депротенинизированные ДНК. Примеры способов введения депротенинизированной ДНК описаны в публикации заявки PCT № WO 90/11092 и патенте США № 5580859. Липосомы, которые могут действовать в качестве носителей для доставки, описаны в патенте США № 5422120; публикациях заявок PCT №№ WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445 и EP 0524968. Дополнительные подходы описаны в Philip, *Mol. Cell Biol.* (1994) 14:2411 и в Woffendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91:1581.

В. Антитело G1 и родственные антитела, полипептиды, полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева.

Данное изобретение охватывает композиции, в том числе фармацевтические композиции, содержащие антитело G1 и его варианты, представленные в табл. 6, или полипептид, имеющий происхождение из антитела G1 и его вариантов, представленных в табл. 6; и полинуклеотиды, включающие последовательности, кодирующие G1 и его варианты или полипептид. Используемые здесь композиции содержат одно или более чем одно антитело или полипептид (который может представлять собой или не представлять собой антитело), связывающийся с CGRP, и/или один или более чем один полинуклеотид, включающий последовательности, кодирующие одно или более чем одно антитело или полипептид, связывающийся с CGRP. Эти композиции дополнительно могут содержать подходящие эксципиенты, такие как фармацевтически приемлемые эксципиенты, включая буферы, которые хорошо известны в данной области техники.

Антагонистические антитела против CGRP и полипептиды по изобретению характеризуются любой (одной или более чем одной) из следующих характеристик: (а) связывание с CGRP; (б) блокирование связывания CGRP с его рецептором(ами); (в) блокирование или уменьшение активации рецептора CGRP (включая активацию cAMP); (г) ингибирование биологической активности CGRP или последующих путей, опосредованных сигнальной функцией CGRP; (д) профилактика, уменьшение интенсивности или лечение любого вида головной боли (например, мигрени); (е) увеличение клиренса CGRP и (ж) ингибирование (уменьшение) синтеза, продукции или высвобождения CGRP.

Соответственно, в изобретении предложено любое из следующих, или композиции (включая фармацевтические композиции), содержащие любое из следующих: (а) антитело G1 или его варианты, представленные в табл. 6; (б) фрагмент или область антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (в) легкую цепь антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (г) тяжелую цепь антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (д) одну или более чем одну варируемую область(и) легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (е) один или более чем один CDR (один, два, три, четыре, пять или шесть CDR) антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (ж) CDR H3 тяжелой цепи антитела G1; (з) CDR L3 легкой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (и) три CDR легкой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (к) три CDR тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл.

6; (л) три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; и (м) антитело, включающее любое одно из (б)-(л). В изобретении также предложены полипептиды, включающие любое одно или более чем одно из приведенных выше.

Фрагменты CDR антитела G1 (включая CDR Чотиа и Кабата) схематически изображены на фиг. 5. Определение областей CDR находится в пределах знаний специалиста в данной области техники. Понятно, что в некоторых воплощениях CDR может представлять собой комбинацию CDR Кабата и Чотиа (также называемую "комбинированный CDR" или "расширенный CDR"). В некоторых воплощениях CDR представляют собой CDR Кабата. В других воплощениях CDR представляют собой CDR Чотиа. Другими словами, в воплощениях с более чем одним CDR, CDR могут представлять собой любые из CDR Кабата, Чотиа, комбинированных CDR или их комбинаций.

В некоторых воплощениях в изобретении предложен полипептид (который может представлять собой или не представлять собой антитело), который содержит по меньшей мере один CDR, по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или все шесть CDR, по существу, идентичные по меньшей мере одному CDR, по меньшей мере двум, по меньшей мере трем, по меньшей мере четырем, по меньшей мере пяти или всем шести GDR G1 или его вариантов, представленных в табл. 6. Другие воплощения включают антитела, которые имеют по меньшей мере два, три, четыре, пять или шесть CDR, по существу, идентичные по меньшей мере двум, трем, четырем, пяти или шести CDR G1 или имеющие происхождение из G1. В некоторых воплощениях по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть CDR по меньшей мере приблизительно на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны по меньшей мере одному, двум, трем, четырем, пяти или шести CDR G1 или его вариантов, представленных в табл. 6. Понятно, что для задач изобретения специфичность связывания и/или общая активность, как правило, сохраняются, хотя степень активности может варьировать по сравнению с G1 или его вариантами, представленными в табл. 6 (может быть больше или меньше).

В изобретении также предложен полипептид (который может представлять собой или не представлять собой антитело), который содержит аминокислотную последовательность G1 или его вариантов, представленных в табл. 6, имеющий любое из следующего: по меньшей мере 5 смежных аминокислот, по меньшей мере 8 смежных аминокислот, по меньшей мере приблизительно 10 смежных аминокислот, по меньшей мере приблизительно 15 смежных аминокислот, по меньшей мере приблизительно 20 смежных аминокислот, по меньшей мере приблизительно 25 смежных аминокислот, по меньшей мере приблизительно 30 смежных аминокислот последовательности G1 или его вариантов, представленных в табл. 6, где по меньшей мере 3 из аминокислот происходят из вариабельной области G1 (фиг. 5) или его вариантов, представленных в табл. 6. В одном из воплощений вариабельная область происходит из легкой цепи G1. В еще одном воплощении вариабельная область происходит из тяжелой цепи G1. Пример полипептида имеет смежные аминокислоты (длины описаны выше) из вариабельных областей как тяжелой, так и легкой цепей G1. В еще одном воплощении 5 (или более) смежных аминокислот происходят из гипервариабельного участка (CDR) G1, представленного на фиг. 5. В некоторых воплощениях смежные аминокислоты происходят из вариабельной области G1.

Аффинность связывания (K_D) антагонистического антитела против CGRP и полипептида в отношении CGRP (такого как человеческий α -CGRP) может составлять от приблизительно 0,06 до приблизительно 200 нМ. В некоторых воплощениях аффинность связывания составляет любое значение из приблизительно 200, 100, приблизительно 50, приблизительно 10, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500, приблизительно 100, приблизительно 60, приблизительно 50, приблизительно 20, приблизительно 15, приблизительно 10, приблизительно 5 или приблизительно 2 пМ. В некоторых воплощениях аффинность связывания составляет менее чем любое значение из приблизительно 250, приблизительно 200, приблизительно 100, приблизительно 50, приблизительно 10, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500, приблизительно 100 или приблизительно 50 пМ.

В изобретении также предложены способы получения любого из этих антител или полипептидов. Антитела по изобретению могут быть получены способами, известными в данной области техники. Полипептиды могут быть получены путем протеолитического или иного расщепления антител рекомбинантными способами (т.е. единичные или слитые полипептиды), как описано выше, или путем химического синтеза. Полипептиды антител, в особенности более короткие полипептиды длиной приблизительно до 50 аминокислот, для удобства получают химическим синтезом. Способы химического синтеза известны в данной области техники и имеются в продаже. Например, антитело может быть получено при помощи автоматического полипептидного синтезатора с использованием твердофазного способа. См. также патенты США №№ 5807715; 4816567 и 6331415.

В еще одном альтернативном воплощении антитела могут быть получены рекомбинантным путем с использованием методик, хорошо известных в данной области техники. В одном из воплощений полинуклеотид включает последовательность, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела G1, представленного в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. В еще одном воплощении полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, клонируют в одном или более чем одном векторе для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующая интересующее антитело, может сохраняться в векторе в клетке-хозяине, и эту

клетку-хозяин затем можно размножать и замораживать для будущего применения. Здесь дополнительно описаны векторы (включающие экспрессирующие векторы) и клетки-хозяева.

Данное изобретение также охватывает одноцепочечные фрагменты варибельной области (scFv) антител по изобретению, таких как G1. Одноцепочечные фрагменты варибельной области получают путем связывания варибельных областей легкой и/или тяжелой цепи с использованием короткого связывающего пептида. Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426. Пример связывающего пептида представляет собой (GGGGS)₃, который образует мостик длиной приблизительно 3,5 нм между карбоксильным концом одной варибельной области и аминоконцом другой варибельной области. Разработаны и применяют линкеры других последовательностей. Bird et al. (1988). В свою очередь, линкеры могут быть модифицированы для дополнительных функций, таких как присоединение лекарств или присоединение к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты могут быть получены либо рекомбинантным, либо синтетическим путем. Для синтетического получения scFv можно применять автоматический синтезатор. Для рекомбинантной продукции scFv подходящая плаزمид, содержащая полинуклеотид, кодирующий scFv, может быть введена в подходящую клетку-хозяин, являющуюся либо эукариотической, такой как клетки дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих, либо прокариотической, такой как *E. coli*. Полинуклеотиды, кодирующие интересующую scFv, могут быть получены при помощи стандартных манипуляций, таких как лигирование полинуклеотидов. Получающаяся в результате scFv может быть выделена с использованием стандартных способов очистки белков, известных в данной области техники.

Также охватываются другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Диатела представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который является слишком коротким для обеспечения возможности объединения двух доменов на одной и той же цепи, тем самым вынуждая домены объединяться с комплементарными доменами другой цепи и образуя два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Например, биспецифические антитела, моноклональные антитела, обладающие специфичностями связывания в отношении по меньшей мере двух различных антигенов, могут быть получены с использованием раскрытых здесь антител. Способы получения биспецифических антител известны в данной области техники (см., например, Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymology* 121:210). Традиционно, рекомбинантное получение биспецифических антител основано на коэкспрессии пар тяжелая цепь-легкая цепь двух иммуноглобулинов, где две тяжелые цепи имеют разную специфичность (Millstein and Cuello, 1983, *Nature* 305, 537-539).

В соответствии с одним из подходов получения биспецифических антител варибельные домены антитела, имеющие желаемые специфичности связывания (антигенсвязывающие центры антитела), подвергают слиянию с последовательностями константного домена иммуноглобулина. Слияние предпочтительно осуществляют с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, включающим по меньшей мере часть шарнирной области CH2 и CH3. Предпочтительно, чтобы константная область первой тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт, необходимый для связывания с легкой цепью, присутствовала по меньшей мере в одном из слияний. ДНК, кодирующие слияния тяжелых цепей иммуноглобулинов и, если желательно, легких цепей иммуноглобулинов, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы и котрансфицируют в подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает значительную гибкость в выборе взаимных соотношений трех полипептидных фрагментов в воплощениях, когда неравные соотношения трех полипептидных цепей, используемых в конструкции, обеспечивают оптимальные выходы. Тем не менее, можно встраивать кодирующие последовательности двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессирующий вектор, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит в результате к высоким выходам, или когда эти соотношения не имеют конкретной значимости.

В одном из подходов биспецифические антитела состоят из тяжелой цепи гибридного иммуноглобулина с первой специфичностью связывания, с одной стороны, и пары тяжелая цепь-легкая цепь гибридного иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания), с другой стороны. Эта асимметричная структура с легкой цепью иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы облегчает отделение желаемого биспецифического соединения от нежелательных комбинаций иммуноглобулиновой цепи. Этот подход описан в заявке РСТ № WO 94/04690, опубликованной 3 марта 1994 г.

Гетероконъюгатные антитела, включающие два ковалентно связанных антитела, также находятся в объеме данного изобретения. Такие антитела используют для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (патент США № 4676980) и для лечения инфекции вируса иммунодефицита (ВИЧ) (публикация РСТ №№ WO 91/00360 и WO 92/200373; EP 03089). Гетероконъюгатные антитела могут быть получены с использованием любых удобных способов перекрестного сшивания. Подходящие сшивающие агенты и способы перекрестного сшивания хорошо известны в данной области техники и описаны в патенте США № 4676980.

Химерные или гибридные антитела также могут быть получены *in vitro* с использованием извест-

ных химических способов синтеза белка, включая те, в которые вовлечены сшивающие агенты. Например, иммунотоксины могут быть сконструированы с использованием реакции дисульфидного обмена или путем образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих реагентов для этой цели включают иминотиолят и метил-4-меркаптобутиримидат.

Гуманизированное антитело, включающее один или более чем один CDR антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6, или один или более чем один CDR, имеющий происхождение из антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6, может быть получено с использованием любых способов, известных в данной области техники. Например, четыре общие стадии могут быть использованы для гуманизации моноклонального антитела.

Данное изобретение охватывает модификации антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6, включающие функционально эквивалентные антитела, которые не влияют значительно на их свойства, и варианты, которые обладают повышенной или пониженной активностью и/или аффинностью. Например, аминокислотная последовательность антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6, может быть мутирована с получением антитела, обладающего желаемой аффинностью связывания с CGRP. Модификация полипептидов представляет собой стандартную практику в данной области техники, и нет необходимости подробно описывать ее здесь. Модификация полипептидов проиллюстрирована в примерах.

Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды, имеющие консервативные замены аминокислотных остатков, одну или более чем одну делецию или добавление аминокислот, которые не приводят к существенным неблагоприятным изменениям функциональной активности, или применение химических аналогов.

Вставки в аминокислотную последовательность включают слияния с amino- и/или карбоксильным концом, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки одного или множества аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры вставок по концу включают антитело с N-концевым метионильным остатком или антитело, слитое с эпитопным концом. Другие варианты вставки в молекулу антитела включают слияние с N- или C-концом антитела фермента или полипептида, которое увеличивает период полувыведения антитела из сыворотки крови.

Варианты с заменой включают удаление по меньшей мере одного аминокислотного остатка из молекулы антитела и встраивание вместо него различных остатков. Сайты, представляющие наибольший интерес для заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные области, но также рассматриваются изменения FR. Консервативные замены представлены в табл. 1 под заголовком "консервативные замены". Если такие замены приводят в результате к изменению биологической активности, то могут быть осуществлены более значительные изменения, обозначенные в табл. 1 как "примеры замен", или как дополнительно описано ниже со ссылкой на классы аминокислот, и продукты могут быть отобраны и подвергнуты скринингу.

Таблица 1

Замены аминокислот		
Исходный остаток	Консервативные замены	Примеры замен
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe;

		Норлейцин
Leu (L)	Ile	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин

Значительные модификации биологических свойств антитела осуществляют путем выбора замен, которые значительно отличаются по их эффекту в отношении поддержания (а) структуры полипептидного каркаса в области замены, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в сайте мишени или (в) объема боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки разделяют на группы, основываясь на общих свойствах боковой цепи:

- (1) неполярные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, He;
- (2) полярные без заряда: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые (отрицательно заряженные): Asp, Glu;
- (4) основные (положительно заряженные): Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro и
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe, His.

Неконсервативные замены осуществляют путем замены представителя одного из этих классов на представителе другого класса.

Любой цистеиновый остаток, не вовлеченный в поддержание правильной конформации антитела, также может быть заменен, как правило, на серин, с улучшением стабильности молекулы к окислению и предотвращением аномального перекрестного связывания. Наоборот, цистеиновая(ые) связь(и) может(гут) быть введена(ы) в антитело для улучшения его стабильности, в частности, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fv-фрагмент.

Модификации аминокислот могут варьировать от замены или модификации одной или более чем одной аминокислоты до полного реконструирования области, такой как вариабельная область. Изменения в вариабельной области могут изменять аффинность и/или специфичность связывания. В некоторых воплощениях в домене CDR осуществляют замены не более чем 1-5 консервативных аминокислот. В других воплощениях в домене CDR осуществляют замены не более чем 1-3 консервативных аминокислот. В других воплощениях домен CDR представляет собой CDR H3 и/или CDRL3.

Модификации также включают гликозилированные и негликозилированные полипептиды, а также полипептиды, обладающие другими посттрансляционными модификациями, такими как, например, гликозилирование различными сахарами, ацетилирование и фосфорилирование. Антитела гликозилированы в консервативных положениях в их константных областях (Jefferis and Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright and Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). Олигосахаридные боковые цепи иммуноглобулинов влияют на функцию белка (Boyd et al., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180) и внутримолекулярное взаимодействие между фрагментами гликопротеина, что может оказать влияние на конформацию и презентуемую трехмерную поверхность гликопротеина (Jefferis and Lund, выше; Wyss and Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416). Олигосахариды также могут служить для нацеливания данного гликопротеина на некоторые молекулы, основываясь на специфических распознающих структурах. Также сообщали о том, что гликозилирование антител оказывает влияние на антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). В частности, сообщали о том, что клетки яичника китайского хомячка (CHO) с регулируемой тетрациклином экспрессией $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII), катализируемым гликозилтрансферазой образованием разрезанного пополам GlcNAc, обладают улучшенной активностью ADCC (Umana et al, 1999, Mature Biotech. 17:176-180).

Гликозилирование антител, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-Гликозилирование относится к присоединению углеводной группировки к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин, аспарагин-X-треонин и аспарагин-X-цистеин, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводной группировки к бо-

ковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. О-Гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, наиболее обычно серину или треонину, хотя также может быть использован 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление сайтов гликозилирования в антитело для удобства осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности, так чтобы она содержала одну или более чем одну из вышеописанных трипептидных последовательностей (для сайтов N-гликозилирования). Изменение также может быть осуществлено путем добавления одного или более чем одного остатка серина или треонина к последовательности исходного антитела, или замены на него (для сайтов О-гликозилирования).

Тип гликозилирования антител также может быть изменен без изменения исходной нуклеотидной последовательности. Гликозилирование в значительной степени зависит от клетки-хозяина, используемой для экспрессии антитела. Поскольку тип клетки, используемой для экспрессии рекомбинантных гликопротеинов, например антител, в качестве потенциальных терапевтических агентов, редко является нативным, можно ожидать изменения типа гликозилирования антител (см., например, Hse et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070).

В дополнение к выбору клеток-хозяев, факторы, влияющие на гликозилирование при рекомбинантной продукции антител, включают способ выращивания, приготовление сред, плотность культуры, насыщение кислородом, pH, схемы очистки и тому подобное. Для изменения типа гликозилирования, достигаемого в конкретном организме-хозяине, предложены различные способы, включающие введение или сверхэкспрессию некоторых ферментов, вовлеченных в продукцию олигосахарида (патенты США №№ 5047335; 5510261 и 5278299). Гликозилирование или некоторые типы гликозилирования могут быть ферментативно удалены из гликопротеина, например, с использованием эндогликозидазы H (Endo H), N-гликозидазы F, эндогликозидазы F1, эндогликозидазы F2, эндогликозидазы F3. Дополнительно, рекомбинантная клетка-хозяин может быть сконструирована путем генетической инженерии таким образом, чтобы быть дефектной по процессингу некоторых типов полисахаридов. Эти и подобные способы хорошо известны в данной области техники.

Другие способы модификации включают применение методик сочетания, известных в данной области техники, включая ферментативные средства, окислительное замещение и хелатообразование, но не ограничиваясь ими. Модификации могут быть использованы, например, для присоединения меток для иммуноанализа. Модифицированные полипептиды G1 получают с использованием способов, признанных в данной области техники, и могут быть отобраны с использованием стандартных анализов, известных в данной области техники, некоторые из которых описаны ниже и в примерах.

В некоторых воплощениях изобретения антитело включает модифицированную константную область, такую как константная область, которая иммунологически инертна или частично инертна, например, не запускает комплементопосредованный лизис, не стимулирует антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) или не активизирует микроглию; или обладает пониженными активностями (по сравнению с немодифицированным антителом) в любом одном или более чем одним из следующего: запуск комплементопосредованного лизиса, стимуляция антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) или активация микроглии. Различные модификации константной области могут быть использованы для достижения оптимального уровня и/или комбинации эффекторных функций. См., например, Morgan et al., *Immunology* 86:319-324 (1995); Lund et al., *J. Immunology* 157:4963-9 157:4963-4969 (1996); Idusogie et al., *J. Immunology* 164:4178-4184 (2000); Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601 (1989); и Jefferis et al. *Immunological Reviews* 163:59-76 (1998). В некоторых воплощениях константная область модифицирована, как описано в *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624; заявке на патент PCT № PCT/GB 99/01441 и/или заявке на патент UK № 9809951.8. В других воплощениях антитело включает константную область тяжелой цепи человеческого IgG2a, содержащую следующие мутации: A330P331 на S330S331 (нумерация аминокислот со ссылкой на последовательность IgG2a дикого типа). *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624. В других воплощениях константная область агликозилирована для N-гликозилирования. В некоторых воплощениях константная область агликозилирована для N-гликозилирования путем мутации гликозилированного аминокислотного остатка или фланкирующих остатков, представляющих собой часть последовательности распознавания N-гликозилирования в константной области. Например, сайт для N-гликозилирования N297 может быть мутирован до A, Q, K или H. См. Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601 (1989); и Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76 (1998). В некоторых воплощениях константная область агликозилирована для N-гликозилирования. Константная область может быть агликозилирована для N-гликозилирования ферментативным путем (таким как удаление углевода при помощи фермента PNGазы) или путем экспрессии в клетке-хозяине, дефектной по гликозилированию.

Другие модификации антитела включают антитела, которые модифицированы, как описано в публикации PCT № WO 99/58572, опубликованной 18 ноября 1999 г. Эти антитела включают, в дополнение к связующему домену, направленному на молекулу-мишень, эффекторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, по существу, гомологичную всему константному домену тяжелой цепи че-

ловеческого иммуноглобулина или его части. Эти антитела способны связываться с молекулой-мишенью без запуска существенного комплементзависимого лизиса или клеточноопосредованного разрушения мишени. В некоторых воплощениях эффекторный домен способен специфически связываться с FcRn и/или FcγRIIb. Они, как правило, основаны на химерных доменах, имеющих происхождение из двух или более чем двух доменов C_H2 тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина. Антитела, модифицированные таким образом, особенно подходят для применения в длительной терапии антителами для того, чтобы избежать воспаления и других отрицательных реакций, присущих обычной терапии антителами.

Данное изобретение включает аффинно зрелые воплощения. Например, аффинно зрелые антитела могут быть получены способами, известными в данной области техники (Marks et al., 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783; Barbas et al., 1994, *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813; Schier et al., 1995, *Gene*, 169:147-155; Yelton et al., 1995, *J. Immunol.*, 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, *J. Immunol.*, 154(7):3310-9; Hawkins et al. 1992, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 и WO 2004/058184).

Следующие способы могут быть использованы для коррекции аффинности антитела и характеристики CDR. Один из путей характеристики CDR антитела и/или изменения (такого как улучшение) аффинности связывания полипептида, такого как антитело, называют "библиотечный сканирующий мутагенез". Как правило, библиотечный сканирующий мутагенез действует следующим образом. Одно или более чем одно положение аминокислоты в CDR заменяют двумя или более чем двумя (например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) аминокислотами с использованием признанных в данной области техники способов. Это создает небольшие библиотеки клонов (в некоторых воплощениях по одной для каждого положения аминокислоты, которую анализируют), каждый из которых состоит из комплекса двух или более чем двух членов (если в каждом положении заменены две или более чем две аминокислоты). Как правило, библиотека также включает клон, включающий нативную (не подвергнутую замене) аминокислоту. Небольшое количество клонов, например приблизительно 20-80 клонов (в зависимости от сложности библиотеки), из каждой библиотеки отбирают в отношении аффинности связывания с полипептидом-мишенью (или другой мишенью связывания) и идентифицируют кандидаты, обладающие повышенным, таким же, пониженным связыванием или отсутствием связывания. Способы определения аффинности связывания хорошо известны в данной области техники. Аффинность связывания может быть определена с использованием поверхностно-плазмонного резонансного анализа Biacore, который обнаруживает не менее чем 2-кратные различия в аффинности связывания. В частности, Biacore является полезным, когда исходное антитело уже связывается с относительно высокой аффинностью, например с K_D, составляющей приблизительно 10 нМ или ниже. Отбор с использованием поверхностно-плазмонного резонанса Biacore описан здесь в примерах.

Аффинность связывания может быть определена с использованием биосенсора Kinexa, сцинтилляционных анализов близкого расстояния, ELISA, иммуноанализа ORIGEN (IGEN), флуоресцентного гашения, флуоресцентного переноса и/или дрожжевого дисплея. Аффинность связывания также может быть выбрана с использованием подходящего биоанализа.

В некоторых воплощениях осуществляют замену в каждом положении аминокислоты в CDR (в некоторых воплощениях по одной) всеми 20 природными аминокислотами с использованием признанных в данной области техники способов мутагенеза (некоторые из которых описаны здесь). Это создает небольшие библиотеки клонов (в некоторых воплощениях по одной для каждого положения аминокислоты, которую анализируют), каждую с комплексом из 20 членов (если все 20 аминокислот заменены в каждом положении).

В некоторых воплощениях библиотека, в которой производят отбор, включает замены в двух или более чем двух положениях, которые могут быть в одном и том же CDR или в двух или более чем двух CDR. Таким образом, библиотека может включать замены в двух или более чем двух положениях в одном CDR. Библиотека может включать замену в двух или более чем двух положениях в двух или более чем двух CDR. Библиотека может включать замену в 3, 4, 5 или более положениях, причем указанные положения обнаружены в двух, трех, четырех, пяти или шести CDR. Замена может быть осуществлена с использованием кодонов с низкой избыточностью. См., например, табл. 2 в Balint et al., (1993), *Gene* 137(1): 109-18).

CDR может представлять собой CDRH3 и/или CDRL3. CDR может представлять собой один или более чем один из CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и/или CDRH3. CDR может представлять собой CDR Кабата, CDR Чотиа или расширенный CDR.

Кандидаты, обладающие улучшенным связыванием, могут быть секвенированы, таким образом давая возможность для идентификации мутанта по замене в CDR, приводящем в результате к улучшенной аффинности (также называемого "улучшенной" заменой). Кандидаты, которые связываются, также могут быть секвенированы, таким образом давая возможность для идентификации замены в CDR, которая сохраняет связывание.

Могут быть проведены множественные раунды отбора. Например, кандидаты (каждый из которых включает замену аминокислоты в одном или более чем одном положении в одном или более чем одном CDR), обладающие улучшенным связыванием, также полезны для конструирования второй библиотеки, содержащей, по меньшей мере, исходную и замененную аминокислоту в каждом улучшенном положе-

нии CDR (то есть положение аминокислоты в CDR, по которому мутант, подвергнутый замене, демонстрирует улучшенное связывание). Получение и скрининг или отбор этой библиотеки дополнительно обсуждается ниже.

Библиотечный сканирующий мутагенез также предоставляет средство для характеристики CDR, поскольку частота клонов, обладающих улучшенным связыванием, таким же связыванием, пониженным связыванием или отсутствием связывания, также дает информацию, касающуюся важности положения каждой аминокислоты для стабильности комплекса антитело-антиген. Например, если положение CDR сохраняет связывание при замене на все 20 аминокислот, такое положение идентифицируют как положение, которое вряд ли необходимо для связывания антигена. Наоборот, если положение CDR сохраняет связывание только при небольшом проценте замен, такое положение идентифицируют как положение, которое является важным для функции CDR. Таким образом, способы библиотечного сканирующего мутагенеза дают информацию, касающуюся положений в CDR, которые могут быть заменены на множество различных аминокислот (включая все 20 аминокислот), и положений в CDR, которые не могут быть заменены или которые могут быть заменены только некоторыми аминокислотами.

Кандидаты, обладающие улучшенной аффинностью, могут быть комбинированы во второй библиотеке, которая включает улучшенную аминокислоту, исходную аминокислоту в этом положении, и дополнительно могут включать дополнительные замены в этом положении в зависимости от сложности библиотеки, которая желательна или допустима с использованием желаемого способа скрининга или отбора. В дополнение, если желательно, положение соседней аминокислоты можно рандомизировать по меньшей мере до двух или более чем двух аминокислот. Рандомизация соседних аминокислот может обеспечивать дополнительную конформационную гибкость в мутантном CDR, которая, в свою очередь, может обеспечивать или облегчать введение большего количества улучшенных мутаций. Библиотека также может включать замену в положениях, которые не демонстрировали улучшенную аффинность в первом раунде скрининга.

Во второй библиотеке отбирают или выбирают члены библиотеки, обладающие улучшенной и/или измененной аффинностью связывания, с использованием любого из способов, известных в данной области техники, включая скрининг с использованием поверхностно-плазмонного резонансного анализа *Biacore*, и отбор с использованием любого из известных в данной области техники способов, включая фазовый дисплей, дрожжевой дисплей и рибосомальный дисплей.

Данное изобретение также охватывает слитые белки, включающие один или более чем один фрагмент или область антитела (такого как G1) или полипептида по изобретению. В одном из воплощений предложен слитый полипептид, который включает по меньшей мере 10 соседних аминокислот вариативной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2 (фиг. 5), и/или по меньшей мере 10 аминокислот вариативной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 1 (фиг. 5). В других воплощениях предложен слитый полипептид, который включает по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25 или по меньшей мере приблизительно 30 соседних аминокислот вариативной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2 (фиг. 5), и/или по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25 или по меньшей мере приблизительно 30 соседних аминокислот вариативной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 1 (фиг. 5). В еще одном воплощении слитый полипептид включает вариативную область легкой цепи и/или вариативную область тяжелой цепи G1, как представлено в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 1 на фиг. 5. В еще одном воплощении слитый полипептид включает один или более чем один CDR G1. В других воплощениях слитый полипептид включает CDR H3 и/или CDR L3 антитела G1. Для целей данного изобретения слитый белок G1 содержит одно или более чем одно антитело G1 и другую аминокислотную последовательность, к которой в нативной молекуле оно не присоединено, например гетерологичную последовательность или гомологичную последовательность из другой области. Примеры гетерологичных последовательностей включают "метку", такую как метку FLAG или метку 6His, но не ограничены ими. Метки хорошо известны в данной области техники.

Слитый полипептид G1 может быть получен с использованием способов, известных в данной области техники, например синтетических или рекомбинантных. Как правило, слитые белки G1 по изобретению получают с помощью экспрессирующего полинуклеотида, кодирующего их, с использованием описанных здесь рекомбинантных способов, хотя они также могут быть получены с использованием других средств, известных в данной области техники, включая, например, химический синтез.

В изобретении также предложены композиции, включающие антитела или полипептиды, происходящие из G1, конъюгированные (например, связанные) с агентом, который облегчает связывание с твердым носителем (таким как биотин или авидин). Для простоты, как правило, ссылаются на G1 или антитела, понимая, что эти способы применимы к любому из описанных здесь воплощений связывания CGRP. Конъюгация, как правило, относится к связыванию этих компонентов, как описано здесь. Связывание (которое, как правило, фиксирует эти компоненты в тесной ассоциации, по меньшей мере, для введения) может быть достигнуто различными путями. Например, возможно прямое взаимодействие между агентом и антителом, когда каждый несет заместитель, способный вступать во взаимодействие с другим. На-

пример нуклеофильная группа, такая как амино или сульфгидрильная группа, на одном может быть способна к взаимодействию с карбонилсодержащей группой, такой как ангидрид или галогенангидрид, или с алкильной группой, содержащей хорошую уходящую группу (например, галогенид), на другом.

Антитело или полипептид по изобретению может быть связан с метящим агентом (альтернативно называемым "метка"), таким как флуоресцентная молекула, радиоактивная молекула или любые другие метки, известные в данной области техники.

В данной области техники известны метки, которые, как правило, обеспечивают (либо прямо, либо опосредованно) сигнал.

В изобретении также предложены композиции (включая фармацевтические композиции) и наборы, включающие антитело G1, и, как следует из данного описания, любые или все из описанных здесь антител и/или полипептидов.

В изобретении также предложены выделенные полинуклеотиды, кодирующие антитела и полипептиды по изобретению (включая антитело, включающее полипептидные последовательности переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи, представленные на фиг. 5), а также векторы и клетки-хозяева, включающие полинуклеотид.

Соответственно, в изобретении предложены полинуклеотиды (или композиции, включая фармацевтические композиции), включающие полинуклеотиды, кодирующие любое из следующих: (а) антитело G1 или его варианты, представленные в табл. 6; (б) фрагмент или область антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (в) легкую цепь антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (г) тяжелую цепь антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (д) одну или более чем одну переменную область легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (е) один или более чем один CDR (один, два, три, четыре, пять или шесть CDR) антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (ж) CDR H3 тяжелой цепи антитела G1; (з) CDR L3 легкой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (и) три CDR легкой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (к) три CDR тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; (л) три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в табл. 6; и (м) антитело, включающее любое из (б)-(л). В некоторых воплощениях полинуклеотид включает любой или оба из полинуклеотид(ов), представленных в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

В еще одном аспекте изобретения предложены полинуклеотиды, кодирующие любые из описанных здесь антител (включая фрагменты антител) и полипептидов, таких как антитела и полипептиды, обладающие нарушенной эффекторной функцией. Полинуклеотиды могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники.

В еще одном аспекте изобретения предложены композиции (такие как фармацевтические композиции), включающие любой из полинуклеотидов по изобретению. В некоторых воплощениях композиция включает экспрессирующий вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий антитело G1, как описано здесь. В другом воплощении композиция включает экспрессирующий вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий любое из описанных здесь антител или полипептидов. В других воплощениях композиция включает любой или оба из полинуклеотидов, представленных в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Экспрессирующие векторы и введение полинуклеотидных композиций дополнительно описано здесь.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ получения любого из описанных здесь полинуклеотидов.

Полинуклеотиды, комплементарные любой из таких последовательностей, также охватываются настоящим изобретением. Полинуклеотиды могут быть одноцепочечными (кодирующими или антисмысловыми) или двухцепочечными и могут представлять собой молекулы ДНК (геномную, кДНК или синтетическую) или РНК. Молекулы РНК включают молекулы человеческой РНК, которые содержат нитроны и соответствуют молекуле ДНК один к одному, и молекулы мРНК, которые не содержат интронов. Дополнительные кодирующие или не кодирующие последовательности не обязательно присутствуют, но могут присутствовать в полинуклеотиде по настоящему изобретению, и полинуклеотид не обязательно, но может быть связан с другими молекулами и/или материалами носителя.

Полинуклеотиды могут включать нативную последовательность (то есть эндогенную последовательность, кодирующую антитело или его фрагмент) или могут включать вариант такой последовательности. Варианты полинуклеотида содержат одну или более чем одну замену, добавку, делецию и/или вставку, так что иммунореактивность кодируемого полипептида не уменьшается по сравнению с нативной иммунореактивной молекулой. Эффект на иммунореактивность кодируемого полипептида, как правило, может быть оценен, как описано здесь. Варианты предпочтительно демонстрируют по меньшей мере приблизительно 70% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80% идентичность и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% идентичность с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей нативное антитело или его фрагмент.

Считают, что две полинуклеотидные или полипептидные последовательности "идентичны", если последовательность нуклеотидов или аминокислот в двух последовательностях одинакова при их совмещении для максимального соответствия, как описано ниже. Сравнения двух последовательностей,

как правило, осуществляют в окне сравнения для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательности. Используемое здесь "окно сравнения" относится к сегменту, составляющему по меньшей мере приблизительно 20 соседних положений, обычно от 30 до приблизительно 75, от 40 до приблизительно 50, в котором последовательность можно сравнивать с последовательностью сравнения, имеющей то же самое количество соседних положений после оптимального совмещения двух последовательностей.

Оптимальное совмещение последовательностей для сравнения может быть осуществлено с использованием программы Megalign в пакете Lasergene биоинформационного программного обеспечения (DNASTAR, Inc., Madison, WI) с использованием параметров по умолчанию. Эта программа включает несколько схем совмещения, описанных в следующих ссылках: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In 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., 1990, Unified Approach, to Alignment and Phylogenies pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, K.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. 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., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Предпочтительно "процент идентичности последовательности" определяют путем сравнения двух оптимально совмещенных последовательностей в окне сравнения, состоящего по меньшей мере из 20 положений, где фрагмент полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может включать добавки или делеции (то есть пробелы), составляющие 20% или менее, обычно от 5 до 15% или от 10 до 12% по сравнению с последовательностью сравнения (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального совмещения двух последовательностей. Процент рассчитывают путем определения количества положений, в которых идентичные основания нуклеиновых кислот или аминокислотные остатки имеются в обеих последовательностях, с получением количества положений, по которым обнаружено соответствие, деления этого количества положений, по которым обнаружено соответствие, на общее количество положений в последовательности сравнения (то есть размер окна) и умножения результатов на 100 с получением процента идентичности последовательности.

Варианты могут также, или альтернативно, быть, по существу, гомологичными нативному гену или его фрагменту или комплементу. Такие полинуклеотидные варианты способны гибридизоваться в умеренно строгих условиях с обнаруживаемой в природе последовательностью ДНК, кодирующей нативное антигено (или комплементарную последовательность).

Подходящие "умеренно строгие условия" включают предварительное промывание в растворе 5×SSC (цитрат натрия с хлоридом натрия), 0,5% додецилсульфата натрия (SDS), 1,0 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) (pH 8,0); гибридизацию при 50-65°C, 5×SSC, в течение ночи; с последующим промыванием дважды при 65°C в течение 20 мин каждым из 2×, 0,5× и 0,2×SSC, содержащим 0,1% SDS.

Используемые здесь "сильно строгие условия" или "условия высокой строгости" представляют собой условия, при которых: (1) используют низкую ионную силу и высокую температуру для промывания, например 0,015M хлорид натрия/0,0015M цитрат натрия/0,1% додецилсульфат натрия при 50°C; (2) при гибридизации используют денатурирующий агент, такой как формамид, например 50% (об./об.) формамид с 0,1% бычьим сывороточным альбумином/0,1% Ficoll/0,1% поливинилпирролидоном/50 мМ буфера фосфата натрия при pH 6,5 с 750 мМ хлорида натрия, 75 мМ цитрата натрия при 42°C; или (3) используют 50% формамид, 5×SSC (0,75M NaCl, 0,075M цитрат натрия), 50 мМ фосфат натрия (pH 6,8), 0,1% пиррофосфат натрия, 5× раствор Денхарта, обработанная ультразвуком ДНК спермы лосося (50 мкг/мл), 0,1% SDS и 10% сульфат декстрана при 42°C, с промывками при 42°C в 0,2×SSC (хлорид натрия/цитрат натрия) и 50% формамиде при 55°C, с последующей промывкой в условиях высокой строгости, состоящих из 0,1×SSC, содержащей ЭДТА, при 55°C. Специалисту в данной области техники понятно, каким образом устанавливать температуру, ионную силу и так далее, что необходимо для приспособления к факторам, таким как длина зонда и тому подобное.

Специалисту в данной области техники понятно, что в результате вырожденности генетического кода существует множество нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептид, как описано здесь. Некоторые из этих полинуклеотидов обладают минимальной гомологией с нуклеотидной последовательностью любого нативного гена. Тем не менее, полинуклеотиды, варьирующие ввиду различий в использовании кодонов, специально охватываются настоящим изобретением. Кроме того, аллели генов, включающих предложенные здесь полинуклеотидные последовательности, входят в объем настоящего изобретения. Аллели представляют собой эндогенные гены, которые изменены в результате одной или более чем одной мутации, такой как делеции, добавления и/или замены нуклеотидов. Получающиеся в результате мРНК и белок не обязательно имеют, но могут иметь измененную структуру или функцию. Аллели могут быть идентифицированы с использованием стандартных способов (таких как гибридиза-

ция, амплификация и/или сравнение последовательностей в базе данных).

Полинуклеотиды по изобретению могут быть получены с использованием химического синтеза, рекомбинантных способов или полимеразной цепной реакции (ПЦР). Способы химического полинуклеотидного синтеза хорошо известны в данной области техники, и нет необходимости описывать их здесь подробно. Специалист в данной области техники может использовать предложенные здесь последовательности и коммерческий ДНК-синтезатор для получения желаемой последовательности ДНК.

Для получения полинуклеотидов с использованием рекомбинантных способов полинуклеотид, включающий желаемую последовательность, может быть встроено в подходящий вектор, а вектор, в свою очередь, может быть введен в подходящую клетку-хозяин для репликации и амплификации, как дополнительно обсуждается здесь. Полинуклеотиды могут быть введены в клетки-хозяева способами, известными в данной области техники. Клетки трансформируют путем введения экзогенного полинуклеотида посредством прямого поглощения, эндоцитоза, трансфекции, F-скрещивания или электропорации. После введения экзогенный полинуклеотид может поддерживаться в клетке в виде неинтегрированного вектора (такого как плазида) или интегрированного в геном клетки-хозяина. Амплифицированный таким образом полинуклеотид может быть выделен из клетки-хозяина с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. См., например, Sambrook et al. (1989).

Альтернативно, ПЦР дает возможность для репродукции последовательностей ДНК. Технология ПЦР хорошо известна в данной области техники и описана в патентах США №№ 4683195, 4800159, 4754065 и 4683202, а также в PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauser Press, Boston (1994).

РНК может быть получена путем использования выделенной ДНК в подходящем векторе и встраивания его в подходящую клетку-хозяин. Когда клетки реплицируются, и ДНК транскрибируется в РНК, РНК затем может быть выделена с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, как изложено, например, в Sambrook et al. (1989).

Подходящие клонирующие векторы могут быть сконструированы в соответствии со стандартными способами или могут быть выбраны из большого количества клонирующих векторов, доступных в данной области техники. Хотя выбранный клонирующий вектор может варьировать в соответствии с клеткой-хозяином, которую предполагается использовать, полезные клонирующие векторы, как правило, обладают способностью к саморепликации, могут нести одну мишень для конкретной рестриктазы, и/или могут нести гены для маркера, который может быть использован при отборе клонов, содержащих вектор. Подходящие примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и его производные, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, фаговые ДНК, и шаттл-векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие клонирующие векторы доступны из коммерческих источников, таких как BioRad, Stratagene и Invitrogen.

Экспрессирующие векторы, как правило, представляют собой способные реплицироваться полинуклеотидные конструкции, содержащие полинуклеотид по изобретению. Предполагают, что экспрессирующий вектор должен реплицироваться в клетках-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде интегральной части хромосомной ДНК. Подходящие экспрессирующие векторы включают плазмиды, вирусные векторы, включая аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы, космиды и экспрессирующий(е) вектор(ы), раскрытые в публикации PCT № WO 87/04462, но не ограничены ими. Векторные компоненты, как правило, могут включать одно или более чем одно из следующего: сигнальную последовательность; ориджин репликации; один или более чем один маркерный ген; подходящие элементы, контролирующие транскрипцию (такие как промоторы, энхансеры и терминатор), но не ограничены ими. Для экспрессии (то есть трансляции) также обычно требуется один или более чем один элемент, контролирующей трансляцию, такой как сайты связывания рибосом, сайты инициации трансляции и стоп-кодона.

Векторы, содержащие интересующие полинуклеотиды, могут быть введены в клетку-хозяин любым из ряда подходящих средств, включая электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, диэтиламиноэтил(ДЭАЭ)-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию и инфекцию (например, когда вектор представляет собой инфекционный агент, такой как вирус коровьей оспы). Выбор встраиваемых векторов или полинуклеотидов часто зависит от свойств клетки-хозяина.

В изобретении также предложены клетки-хозяева, включающие любой из описанных здесь полинуклеотидов. Любые клетки-хозяева, способные к сверхэкспрессии гетерологичных ДНК, могут быть использованы с целью выделения генов, кодирующих интересующее антитело, полипептид или белок. Не ограничивающие примеры клеток-хозяев млекопитающих включают клетки COS, HeLa и CHO, но не ограничены ими. См. также публикацию PCT № WO 87/04462. Подходящие клетки-хозяева, отличные от клеток млекопитающих, включают прокариоты (такие как *E. coli* или *V. subtilis*) и дрожжи (такие как *S. cerevisiae*, *S. pombe* или *K. lactis*). Предпочтительно клетки-хозяева экспрессируют кДНК на уровне приблизительно в 5 раз больше, более предпочтительно в 10 раз больше, еще более предпочтительно в 20 раз больше относительно уровня соответствующего интересующего эндогенного антитела или белка, если они присутствуют в клетках-хозяевах. Отбор клеток-хозяев для специфического связывания с A□1-40

осуществляют путем иммуноанализа или при помощи клеточного сортера с возбуждением флуоресценции (FACS). Может быть идентифицирована клетка, сверхэкспрессирующая антитело или белок, представляющие интерес.

Г. Композиции.

Композиции, используемые в способах по изобретению, содержат эффективное количество описанного здесь антагонистического антитела против CGRP или полипептида, являющегося производным антагонистического антитела против CGRP. Примеры таких композиций, а также того, как их готовить, также описаны ранее и будут описаны ниже. В одном из воплощений композиция дополнительно содержит антагонист CGRP. В еще одном воплощении композиция содержит одно или более чем одно антагонистическое антитело против CGRP. В других воплощениях антагонистическое антитело против CGRP распознает человеческий CGRP. В других воплощениях антагонистическое антитело против CGRP является гуманизированным. В другом воплощении антагонистическое антитело против CGRP содержит константную область, которая не запускает ненужный или нежелательный иммунный ответ, такой как антителоопосредованный лизис или ADCC. В других воплощениях антагонистическое антитело против CGRP содержит один или более чем один CDR антитела G1 (такой как один, два, три, четыре, пять или в некоторых воплощениях все шесть CDR G1). В некоторых воплощениях антагонистическое антитело против CGRP представляет собой человеческое антитело.

Понятно, что композиции могут содержать более чем одно антагонистическое антитело против CGRP (например, смесь антагонистических антител против CGRP, которые распознают различные эпитопы CGRP). Другие примеры композиций содержат более чем одно антагонистическое антитело против CGRP, которые распознают тот(те) же самый(ые) эпитоп(ы), или различные виды антагонистических антител против CGRP, которые связываются с различными эпитопами CGRP.

Композиция, используемая в настоящем изобретении, дополнительно может содержать фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы (Remington: The Science and practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K.E. Hoover.) в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы не токсичны для реципиентов в данных дозах и концентрациях и могут содержать буферы, такие как фосфатный, цитратный буфер и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецидиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензэтония; фенол, бутил- или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и метакрезол); низкомолекулярные (меньше чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстраны; хелатообразователи, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Фармацевтически приемлемые эксципиенты дополнительно описаны здесь.

Антагонистическое антитело против CGRP и их композиции также могут быть использованы в сочетании с другими агентами, которые служат для усиления и/или дополнения эффективности агентов.

Д. Наборы.

В изобретении также предложены наборы для применения в способах по настоящему изобретению. Наборы по изобретению включают один или более чем один контейнер, содержащий описанное здесь антагонистическое антитело против CGRP (такое как гуманизированное антитело) или полипептид и инструкции по применению в соответствии с любым из описанных здесь способов по изобретению. Как правило, эти инструкции содержат описание введения антагонистического антитела против CGRP для лечения, уменьшения интенсивности или профилактики головной боли (такой как мигрень) в соответствии с любым из описанных здесь способов. Набор дополнительно может содержать описание выбора индивидуума, подходящего для лечения, основываясь на идентификации того, страдает ли индивидуум головной болью или имеет риск возникновения головной боли. В других воплощениях инструкции содержат описание введения индивидууму, имеющему риск возникновения головной боли (такой как мигрень), антагонистического антитела против CGRP.

В некоторых воплощениях антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых воплощениях антитело представляет собой человеческое антитело. В других воплощениях антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых воплощениях антитело содержит один или более чем один CDR антитела G1 (такой как один, два, три, четыре, пять или в некоторых воплощениях все шесть CDRG1).

Инструкции, относящиеся к применению антагонистического антитела против CGRP, как правило, включают информацию, касающуюся дозы, схемы введения доз и пути введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут представлять собой стандартные дозы, контейнеры, содержащие большее количество компонента (например, многодозовые упаковки) или субъединичные дозы. Инструкции, по-

ставляемые в наборах по изобретению, типично представляют собой инструкции, написанные на этикетке или вкладыше в упаковку (например, бумажный лист, включенный в набор), но также приемлемы машиночитаемые инструкции (например, инструкции, записанные на магнитный носитель или оптический накопительный диск).

Этикетка или вкладыш в упаковку указывает, что композицию применяют для лечения, уменьшения интенсивности и/или профилактики головной боли (такой как мигрень). Инструкции могут быть приведены для практического применения любого из описанных здесь способов.

Наборы по изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает флаконы, бутылки, сосуды, пластиковые упаковки (например, запаяный MuTag или полиэтиленовые мешки) и т.п., но не ограничены ими. Также охватываются упаковки для применения в комбинации со специфическим устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или устройство для инфузии, такое как мини-насос. Набор может быть выполнен с возможностью стерильного доступа к содержимому (например, контейнер может представлять собой упаковку с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, прокальваемую иглой для подкожной инъекции). Контейнер также может быть выполнен с возможностью стерильного доступа к содержимому (например, контейнер может представлять собой упаковку с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, прокальваемую иглой для подкожной инъекции). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антагонистическое антитело против CGRP. Контейнер дополнительно может содержать второй фармацевтически активный агент.

Наборы возможно могут включать дополнительные компоненты, такие как буферы, и интерпретируемую информацию. Как правило, набор содержит контейнер и этикетку или вкладыш(и) в упаковку на контейнере или в ассоциации с ним.

Следующие примеры предложены для иллюстрации, но не для ограничения изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение и характеристика моноклональных антител против CGRP.

Получение антител против CGRP. Для получения антител против CGRP, обладающих перекрестной реактивностью в отношении крысиного и человеческого CGRP, мышей иммунизировали 25-100 мкг человеческого α -CGRP или β -CGRP, конъюгированного с KLH в адьюванте (50 мкл на подушечку лапы, 100 мкл суммарно на мышь), с различными интервалами.

Иммунизацию, как правило, осуществляли, как описано в Geerligts H.J. et al., 1989, J. Immunol. Methods 124:95-102; Kenney J.S. et al., 1989, J. Immunol. Methods 121:157-166; и Wicher K. et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89:128-135. Мышей сначала иммунизировали 50 мкг человеческого α -CGRP или β -CGRP, конъюгированного с KLH в CFA (полном адьюванте Фрейнда). Через 21 сутки мышей повторно иммунизировали 25 мкг человеческого β -CGRP (для мышей, которых первоначально иммунизировали человеческим α -CGRP) или α -CGRP (для мышей, которых первоначально иммунизировали β -CGRP), конъюгированным с KLH в IFA (неполном адьюванте Фрейнда). Через 23 дня после второй иммунизации осуществляли третью иммунизацию 25 мкг крысиного α -CGRP, конъюгированного с KLH в IFA. Через 10 суток титры антитела тестировали с использованием ELISA. После третьей иммунизации через 34 дня провели четвертую иммунизацию 25 мкг пептида (крысиный α -CGRP-KLH). Окончательную бустер-иммунизацию осуществляли 100 мкг растворимого пептида (крысиный α -CGRP) через 32 дня после четвертой иммунизации.

Спленоциты получали у иммунизированной мыши и подвергали слиянию с клетками миеломы NSO в соотношении 10:1 с использованием полиэтиленгликоля 1500. Гибриды наносили в 96-луночные планшеты в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), содержащей 20% лошадиную сыворотку крови и 2-оксалоацетат/пируват/инсулин (Sigma), и начинали отбор с использованием гипоксантина/аминоптерина/тимидина. На 8 сутки во все лунки добавляли 100 мкл DMEM, содержащей 20% лошадиную сыворотку. Супернатанты гибридов отбирали посредством иммуноанализа с захватом антитела. Определение класса антитела осуществляли с использованием класс-специфичных вторичных антител.

Отбирали панель линий клеток, продуцирующих моноклональное антитело, на основе их связывания с человеческим и крысиным CGRP для дополнительного определения характеристик. Эти антитела и характеристики представлены ниже в табл. 2 и 3.

Очистка и получение фрагмента Fab. Моноклональные антитела, отобранные для дополнительного определения характеристик, очищали из супернатантов культур гибридомы с использованием аффинной хроматографии с белком А. Супернатанты уравнивали до pH 8. Затем супернатанты наносили на колонку с белком A MabSelect (Amersham Biosciences # 17-5199-02), уравновешенную PBS до pH 8. Колонку промывали 5 объемами колонки PBS с pH 8. Антитела элюировали 50 mM цитрат-фосфатным буфером, pH 3. Элюированные антитела нейтрализовали 1M фосфатным буфером, pH 8. Очищенные антитела подвергали диализу с PBS, pH 7,4. Концентрации антитела определяли посредством SDS-PAGE с использованием стандартной кривой для мышинового моноклонального антитела.

Fabs получали путем папаинового протеолиза полноразмерного антитела с использованием набора

Immunopure Fab (Pierce # 44885) и очищали путем пропускания через хроматографическую колонку с белком А в соответствии с указаниями производителя. Концентрации определяли путем ELISA и/или электрофореза в SDS-PAGE с использованием в качестве стандарта известной концентрации Fab (определенной путем аминокислотного анализа), и при A280 с использованием $IOD=0,6$ мг/мл (или теоретического эквивалента на основе аминокислотной последовательности).

Определение аффинности Fab. Аффинности моноклональных антител против CGRP определяли при 25 или 37°C с использованием системы поверхностно-плазмонного резонанса Biacore3000™ (SPR) (Biacore, INC, Piscaway NJ) с использованием буфера для анализа от производителя HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% об./об. поверхностно-активного вещества P20). Аффинность определяли путем связывания пептидов CGRP с биотинилированием по N-концу (заказанных в GenScript Corporation, New Jersey или Global Peptide Services, Colorado) через предварительно иммобилизованный стрептавидин на чипе SA и измерения кинетики связывания антитела Fab, титрованного на поверхности CGRP. Биотинилированный CGRP разбавляли в HBS-EP и вводили в чип в концентрации менее чем 0,001 мг/мл. С использованием различного времени потока через отдельные каналы чипа достигали двух диапазонов плотности антигена: <50 единиц реакции (RU) для подробных кинетических исследований и приблизительно 800 RU для исследований концентрации и скрининга. Двух- или трехкратные серийные разведения типично в концентрациях от 1 мкМ до 0,1 нМ (с целью получения оцененной 0,1-10× величины K_D) очищенных фрагментов Fab вводили в течение 1 мин при 100 мкл/мин и обеспечивали время диссоциации 10 мин. После каждого цикла связывания поверхности регенерировали, используя 25 mM NaOH в 25% об./об. этаноле, который выдерживал сотни циклов.

Кинетические скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) получали одновременно путем подгонки данных в 1:1 модели связывания Лэнгмюра (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) с использованием программы BIAevaluation. Общие значения равновесной константы диссоциации (K_D) или "аффинности" рассчитывали из соотношения $K_D=k_{off}/k_{on}$. Аффинности для мышинных Fab фрагментов представлены в табл. 2 и 3.

Эпитопное картирование мышинных антител против CGRP. Для определения эпитопа, по которому антитела против CGRP связываются с человеческим α -CGRP, аффинности связывания фрагментов Fab с различными фрагментами CGRP измеряли, как описано выше путем присоединения биотинилированных по N-концу фрагментов CGRP к сенсорному чипу SA по аминокислотам 19-37 и аминокислотам 25-37. На фиг. 1 представлены их аффинности связывания, измеренные при 25°C. Как показано на фиг. 1, все антитела, за исключением антитела 4901, связываются с фрагментами 19-37 и 25-37 человеческого α -CGRP с аффинностью, подобной их аффинности связывания с полноразмерным человеческим α -CGRP (1-37). Антитело 4901 связывается с фрагментом 25-37 человеческого α -CGRP с аффинностью, которая в шесть раз ниже, чем связывание с полноразмерным фрагментом человеческого α -CGRP в основном ввиду потери диссоциации. Данные свидетельствуют о том, что эти антитела против CGRP, как правило, связываются с C-концом CGRP.

Сканирование аланином осуществляли для того, чтобы дополнительно охарактеризовать аминокислоты в человеческом α -CGRP, вовлеченные в связывание антител против CGRP. Различные варианты человеческого α -CGRP с единичными аланиновыми заменами получали путем пептидного синтеза. Их аминокислотные последовательности представлены в табл. 4 наряду со всеми другими пептидами, используемыми в анализе Biacore. Аффинности фрагментов Fab антител против CGRP в отношении этих вариантов определяли с использованием Biacore, как описано выше. Как показано на фиг. 1, все 12 антител нацелены на C-концевой эпитоп, причем аминокислота F37 представляет собой наиболее ключевой остаток. Мутация F37 на аланин значительно снижала аффинность или даже полностью нокаутировала связывание антител против CGRP с пептидом. Следующий наиболее важный аминокислотный остаток представляет собой G33, однако аланиновая замена в этом положении оказывала влияние только на высокоаффинные антитела (7E9, 8B6, 10A8 и 7D11). Аминокислотный остаток S34 также играет существенную, но меньшую роль в связывании этих четырех высокоаффинных антител.

Таблица 2

Характеристики связывания моноклональных антител против CGRP с человеческим α -CGRP и их антагонистическая активность

Антитела	K_D для человеческого α -CGRP при 25°C (нМ)	K_D для человеческого α -CGRP при 37°C (нМ)	Клеточное блокирование связывания человеческого α -CGRP с его рецептором при 25°C (измеренное путем активации cAMP)	IC_{50} (нМ сайты связывания) при 25°C (комнатная темп.), измеренная в анализе связывания с радиолигандом
7E9	1,0	0,9	есть	2,5
8B6	1,1	1,2	есть	4,0
10A8	2,1	3,0	есть	н.о.
7D11	4,4	5,4	есть	н.о.
6H2	9,3	42	есть	12,9
4901	61	139	есть	58

14E10	80	179	есть	н.о.
9B8	85	183	нет	н.о.
13C2	94	379	нет	н.о.
14A9	148	581	нет	н.о.
6D5	210	647	нет	н.о.
1C5	296	652	нет	н.о.

Сноска: Антитело 4901 имеется в продаже (Sigma, кат. № C7113).
н.о. означает не определено

Таблица 3

Характеристики связывания моноклональных антител против CGRP с крысиным α -CGRP и антагонистическая активность

Антитела	K_D для крысиного α -CGRP при 37°C (нМ)	Клеточное блокирование связывания крысиного α -CGRP с его рецептором при 25°C (измеренное путем активации cAMP)	Блокирование <i>in vivo</i> в анализе на подкожном нерве
4901	3,4	есть	есть
7E9	47	есть	есть
6H2	54	нет	нет
8B6	75	есть	есть
7D11	218	есть	есть
10A8	451	нет	н.о.
9B8	876	нет	н.о.
14E10	922	нет	н.о.
13C2	>1000	нет	н.о.
14A9	>1000	нет	н.о.
6D5	>1000	нет	н.о.
1C5	>1000	нет	н.о.

н.о. означает, что для данного антитела тестирование не проводилось

Таблица 4

Аминокислотные последовательности фрагментов человеческого α -CGRP (SEQ ID NO: 15-40) и родственных пептидов (SEQ ID NO: 41-47). Все пептиды амидированы по С-концу, за исключением SEQ ID NO: 36-40. Остатки, выделенные жирным шрифтом, указывают на точечные мутации

CGRP	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
1-37 (ДТ)	ACDTATCV THRLAGLLSRSGGVV KNNFVPTNVGSKAF	15
8-37	V THRLAGLLSRSGGVV KNNFVPTNVGSKAF	16
19-37	SGGVV KNNFVPTNVGSKAF	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
крысиный α (1-37)	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSEAF	41
крысиный α (19-37)	SGGVVKDNFVPTNVGSEAF	42
человеческий β (1-37)	ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKS NFVPTNVGSKAF	43
крысиный β (1-37)	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSKAF	44
человеческий кальцитонин (1-32)	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	45
человеческий амилин (1-37)	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNGAILSSSTNVGSNTY	46
человеческий адреномедуллин (1-52)	YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTCTVQKLANHIYQFTDKD KDNVAPRSKISPQGY	47

Пример 2. Скрининг антагонистических антител против CGRP с использованием анализов *in vitro*.

Мышиные антитела против CGRP подвергали дополнительному скринингу в отношении антагонистической активности *in vitro* с использованием анализа клеточной активации cAMP и анализа связывания.

Антагонистическую активность измеряли с использованием анализа с AMP. 5 мкл человеческого или крысиного α -CGRP (конечная концентрация 50 нМ) в присутствии или в отсутствие антитела против CGRP (конечная концентрация 1-3000 нМ), либо крысиного α -CGRP, либо человеческого α -CGRP (конечная концентрация 0,1 нМ-10 мкМ в качестве положительного контроля для активации с AMP) дозировали в 384-луночный планшет (Nunc, кат. № 264657). 10 мкл клеток (человеческий SK-N-MC, если используют человеческий α -CGRP, или крысиный L6 из ATCC, если используют крысиный α -CGRP) в стимулирующем буфере (20 мМ HEPES, pH 7,4, 146 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂ и 500 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX)) добавляли в лунки планшета. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин.

После инкубации активацию cAMP осуществляли с использованием анализа ферментативной фрагментарной комплементации HitHunter™ (Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями производителя. Анализ основан на генетически сконструированном ферменте β -галактозидазе, состоящем из двух фрагментов, называемых ферментативным акцептором (EA) и ферментативным донором (ED). Когда два фрагмента разделены, фермент не активен. Когда фрагменты находятся вместе, они могут спон-

танно рекомбинироваться с образованием активного фермента в процессе, называемом комплементацией. В платформе для анализа EFC используют пептидный конъюгат ED-cAMP, в котором с AMP распознается антителами против cAMP. Этот фрагмент ED способен к реассоциации с EA с образованием активного фермента. В анализе антитело против cAMP оптимально титруют для связывания с конъюгатом ED-cAMP и ингибирования образования фермента. Уровни cAMP в образцах клеточного лизата конкурируют с конъюгатом ED-cAMP за связывание с антителом против cAMP. Количество свободного конъюгата ED в анализе пропорционально концентрации с AMP. Таким образом, cAMP измеряют по образованию активного фермента, которое количественно оценивают по расходу люминесцентного субстрата β -галактозидазы. Анализ активации cAMP осуществляли путем добавления 10 мкл буфера для лизиса и антитела против cAMP (отношение 1:1) с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 60 мин. Затем в каждую лунку добавляли по 10 мкл реагента ED-cAMP и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл реагента EA и смеси CL (содержащей субстрат) (отношение 1:1) и инкубировали в течение 1-3 ч или в течение ночи при комнатной температуре. Планшет считывали с частотой 1 с/лунку в аппарате PMT или 30 с/позицию в аппарате для визуализации. Антитела, ингибирующие активацию cAMP посредством α -CGRP, идентифицировали в табл. 2 и 3 выше (обозначение "есть"). Данные в табл. 2 и 3 указывают на то, что антитела, демонстрирующие антагонистическую активность в данном анализе, как правило, обладают высокой аффинностью. Например, антитела, имеющие K_D (определенную при 25°C) приблизительно 80 нМ или менее в отношении человеческого α -CGRP, или имеющие K_D (определенную при 37°C) приблизительно 47 нМ или менее в отношении крысиного α -CGRP, продемонстрировали антагонистическую активность в этом анализе.

Анализ связывания радиолиганда. Анализ связывания осуществляли для измерения IC_{50} антитела против CGRP при блокировании связывания CGRP с рецептором, как описано ранее. Zimmermann et al., *Peptides* 16:421-4, 1995; Mallee et al., *J. Biol. Chem.* 277:14294-8, 2002. Мембраны (25 мкг) клеток SK-N-MC инкубировали в течение 90 мин при комнатной температуре в буфере для инкубации (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 0,1% бычий сывороточный альбумин (BCA)), содержащем 10 пМ ¹²⁵I-человеческого α -CGRP в общем объеме 1 мл. Для определения средних ингибирующих концентраций (IC_{50}), антитела или немеченный CGRP (в качестве контроля) из раствора с приблизительно 100-кратной концентрацией растворяли до различных концентраций в буфере для инкубации и инкубировали одновременно с мембранами и 10 пМ ¹²⁵I-человеческого α -CGRP. Инкубацию останавливали путем фильтрации через фильтр из стекломикроволокна (GF/B, 1 мкм), которые блокировали 0,5% полиэтиленимином. Строили кривые зависимости доза-ответ и значения K_i определяли с использованием уравнения $K_i = IC_{50} / (1 + ([\text{лиганд}] / K_D))$; где равновесная константа диссоциации $K_D = 8$ пМ для человеческого α -CGRP с рецептором CGRP1, как представлено в клетках SK-N-MC, и максимальная величина связывания $V_{max} = 0,025$ пмоль/мг белка. Приведенное значение IC_{50} (в выражении для молекул IgG) переводили на сайты связывания (путем умножения на 2) так, чтобы его можно было сравнить с аффинностями (K_D), определенными в *Biacore* (см. табл. 2).

В табл. 2 представлены IC_{50} для мышинных антител 7E9, 8B6, 6H2 и 4901. Данные указывают на то, что аффинность антитела, как правило, коррелирует с IC_{50} : антитела с более высокой аффинностью (более низкие значения K_D) имеют более низкие IC_{50} в анализе связывания радиолиганда.

Пример 3. Действие антагонистических антител против CGRP на расширение кровеносных сосудов в коже, вызванное путем стимуляции подкожного нерва крысы.

Для тестирования антагонистической активности антител против CGRP действие антител на расширение сосудов кожи путем стимуляции подкожного нерва крысы тестировали с использованием ранее описанной крысиной модели. Escott et al., *Br. J. Pharmacol.* 110:772-776, 1993. В этой крысиной модели электрическая стимуляция подкожного нерва вызывала высвобождение CGRP из нервных окончаний, приводя в результате к увеличению кровотока в коже. Кровоток в коже лап самцов крыс Sprague Dawley (170-300 г, из Charles River Hollister) измеряли после стимуляции подкожного нерва. Крыс поддерживали в состоянии анестезии с 2% изофлураном. Бретилия тозилат (30 мг/кг, вводимый в.в.) давали в начале эксперимента для минимизации сужения кровеносных сосудов ввиду сопутствующей стимуляции симпатических волокон подкожного нерва. Температуру тела поддерживали при 37°C, используя ректальный зонд, термостатически связанного с контролируемой по температуре нагревающей пластиной. Соединения, включающие антитела, положительный контроль (CGRP 8-37) и разбавитель (PBS, 0,01% Tween 20), вводили внутривенно через правую бедренную вену за исключением эксперимента, представленного на фиг. 3, тестируемое соединение и контроль инъецировали через хвостовую вену, и для экспериментов, представленных на фиг. 2А и 2В, антитела 4901 и 7D11 инъецировали внутривенно (в.б.). Соединение CGRP 8-37 (антагонист расширения кровеносных сосудов) в качестве положительного контроля вводили ввиду его короткого периода полувыведения за 3-5 мин до стимуляции нерва при 400 нмоль/кг (200 мкл). Tan et al., *Clin. Sci.* 89:656-73, 1995. Антитела вводили в различных дозах (1, 2,5, 5, 10 и 25 мг/кг).

Для экспериментов, представленных на фиг. 2А и 2В, антитело 4901 (25 мг/кг), антитело 7D11 (25

мг/кг) или разбавитель в качестве контроля (PBS с 0,01% Tween 20) вводили внутривенно (в.в.) за 72 ч до стимуляции электрическим импульсом. Для экспериментов, представленных на фиг. 3, антитело 4901 (1, 2,5, 5 или 25 мг/кг) или разбавитель в качестве контроля (PBS с 0,01% Tween 20) вводили внутривенно за 24 ч до стимуляции электрическим импульсом. После введения антител или разбавителя в качестве контроля подкожный нерв правой задней конечности извлекали хирургическим путем, проксимально надрезали и покрывали пластиковой оберткой для предотвращения высыхания. Лазерный доплеровский зонд помещали на медио-дорсальную сторону кожи задней конечности, представляющей собой область, иннервируемую подкожным нервом. Кровоток в коже, измеренный в виде потока клеток крови, контролировали с использованием лазерного доплеровского измерителя потока. Когда установился стабильный базовый поток (менее чем 5% варьирование) в течение по меньшей мере 5 мин, нерв помещали на платиновые биполярные электроды и подвергали электрической стимуляции 60 импульсами (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с) и затем вновь через 20 мин. Кумулятивное изменение кровотока в коже оценивали по площади под кривой зависимости потока от времени (AUC, эквивалентной изменению потока, умноженному на изменение времени) для каждого ответа в виде изменения потока на стимуляцию электрическим импульсом. Получали средний ответ в виде кровотока для двух стимуляций. Животных поддерживали в состоянии анестезии в течение периода от 1 до 3 ч.

Как показано на фиг. 2А и 2В, увеличение кровотока, стимулированное применением электрических импульсов на подкожный нерв, ингибировалось присутствием CGRP 8-37 (400 нмоль/кг, вводимого в.в.), антитела 4901 (25 мг/кг, вводимого в.б.) или антитела 7D11 (25 мг/кг, вводимого в.б.) по сравнению с контролем. CGRP 8-37 вводили за 3-5 мин до стимуляции подкожного нерва; и антитела вводили за 72 ч до стимуляции подкожного нерва. Как показано на фиг. 3, увеличение кровотока, стимулированное путем применения электрических импульсов на подкожный нерв, ингибировалось присутствием антитела 4901 в различных дозах (1, 2,5, 5 и 25 мг/кг), вводимого внутривенно за 24 ч до стимуляции подкожного нерва.

Для экспериментов, представленных на фиг. 4А и 4В, подкожный нерв извлекали хирургическим путем перед введением антитела. Подкожный нерв правой задней конечности извлекали хирургическим путем, проксимально надрезали и покрывали пластиковой оберткой для предотвращения высыхания. Лазерный доплеровский зонд помещали на медио-дорсальную сторону кожи задней конечности, представляющей собой область, иннервируемую подкожным нервом. Кровоток в коже, измеренный в виде потока клеток крови, контролировали с использованием лазерного доплеровского измерителя потока. Через 30-45 мин после инъекции бретилия тозилата, когда устанавливался стабильный базовый поток (менее чем 5% варьирование) в течение по меньшей мере 5 мин, нерв помещали на платиновые биполярные электроды и подвергали электрической стимуляции (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с) и затем вновь через 20 мин. Среднее значение для ответа в виде кровотока для этих двух стимуляций использовали для установления базового ответа (время 0) на электрическую стимуляцию. Антитело 4901 (1 или 10 мг/кг), антитело 7E9 (10 мг/кг), антитело 8B6 (10 мг/кг) или разбавитель (PBS с 0,01% Tween 20) затем вводили внутривенно (в.в.). Нерв последовательно стимулировали (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с) через 30, 60, 90 и 120 мин после введения антитела или разбавителя. Животных поддерживали в состоянии анестезии в течение приблизительно 3 ч. Кумулятивное изменение кровотока в коже оценивали по площади под кривой зависимости потока от времени (AUC, которая равна изменению потока, умноженному на изменение времени) для каждого ответа в виде потока на стимуляцию электрическими импульсами.

Как показано на фиг. 4А, увеличение кровотока, стимулированное путем применения электрических импульсов на подкожный нерв, значительно ингибировалось в присутствии антитела 4901, вводимого в.в. в количестве 1 мг/кг, когда стимуляцию электрическим импульсом применяли через 60, 90 и 120 мин после введения антитела, и увеличение кровотока, стимулированное путем применения электрических импульсов на подкожный нерв, значительно ингибировалось в присутствии антитела 4901, вводимого в.в. в количестве 10 мг/кг, когда стимуляцию электрическим импульсом применяли через 30 мин, 60 мин, 90 мин и 120 мин после введения антитела. На фиг. 4В показано, что увеличение кровотока, стимулированное путем применения электрических импульсов на подкожный нерв, значительно ингибировалось в присутствии антитела 7E9 (10 мг/кг, вводимого в.в.), когда стимуляцию электрическим импульсом применяли через 30, 60, 90 и 120 мин после введения антитела, и в присутствии антитела 8B6 (10 мг/кг, вводимого в.в.), когда стимуляцию электрическим импульсом применяли через 30 мин после введения антитела.

Эти данные указывают на то, что антитела 4901, 7E9, 7D11 и 8B6 являются эффективными для блокирования активности CGRP, измеренной по расширению кровеносных сосудов, вызванному стимуляцией подкожного нерва крысы.

Пример 4. Характеристика антитела против CGRP G1 и его вариантов.

Аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи антитела против CGRP G1 представлены на фиг. 5. Следующие способы использовали для экспрессии и определения характеристик антитела G1 и его вариантов.

Использовали экспрессирующий вектор. Экспрессию Fab-фрагмента антител осуществляли под контролем промотора lacZ, индуцируемого изопропилтиогаляктозидом (ИПТГ), подобного описанному в

Barbas (2001) Phage display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press pg 2.10. Vector pComb3X), однако, модификации включали добавление и экспрессию следующих дополнительных доменов: константного домена легкой цепи к-человеческого антитела и константного домена СН1 человеческого иммуноглобулина IgG2, С-области γ -2 цепи Ig, номер белка P01859; легкой цепи к иммуноглобулина (*homo sapiens*), номер белка CAA09181.

Получение Fab в небольшом масштабе. Начиная с *E. coli*, трансформированной библиотекой Fab (с использованием компетентных к электропорации клеток TG1 или химически компетентных клеток Top 10), единичные колонии использовали для инокуляции основного планшета (агар Луриа-Бертани (LB) + карбенициллин (50 мкг/мл) + 2% глюкоза) и рабочего планшета (2 мл/лунку, 96-луночный планшет, содержащий 1,5 мл LB + карбенициллин (50 мкг/мл) + 2% глюкоза). Планшет покрывали газопроницаемой адгезивной пленкой (ABgene, Surrey, UK). Оба планшета инкубировали при 30°C в течение 12-16 ч; рабочий планшет интенсивно встряхивали. Основной планшет хранили при 4°C до использования, тогда как клетки рабочего планшета осаждали центрифугированием (4000 об/мин, 4°C, 20 мин) и ресуспендировали в 1,0 мл LB + карбенициллин (50 мкг/мл) + 0,5 мМ ИПТГ для того, чтобы вызвать экспрессию Fab путем интенсивного встряхивания в течение 5 ч при 30°C. Индуцированные клетки центрифугировали при 4000 об/мин, 4°C в течение 20 мин и ресуспендировали в 0,6 мл буфера Bioscye HB-SEP (10 мМ HEPES pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% об./об. P20). Лизис клеток, ресуспендированных в HBS-P, осуществляли путем одного цикла замораживания (приблизительно 80°C), затем оттаивания при 37°C. Клеточные лизаты центрифугировали при 4000 об/мин, 4°C в течение 1 ч для отделения клеточного дебриса от супернатантов, содержащих Fab, которые затем фильтровали (0,2 мкм) с использованием 96-луночного фильтрационного планшета системы мультискринингового анализа Millipore и вакуумной системы. Bioscye использовали для анализа фильтрованных супернатантов путем их инъекции через CGRP на сенсорном чипе. Клоны с отобранной аффинностью, экспрессирующие Fab, извлекали из основного планшета с получением матричной ДНК для ПЦР, секвенирования и получения плазмиды.

Крупномасштабное получение Fab. Для получения кинетических параметров Fab экспрессировали в крупном масштабе следующим образом. В колбу Эрленмейера, содержащую 150 мл LB+карбенициллин (50 мкг/мл)+2% глюкозу, инокулировали 1 мл "стартовой" ночной культуры из клона с отобранной аффинностью *E. coli*, экспрессирующего Fab. Оставшуюся часть стартовой культуры (приблизительно 3 мл) использовали для получения плазмидной ДНК (набор QIAprep mini-prep, Qiagen) для секвенирования и дополнительной манипуляции. Значительную часть культуры инкубировали при 30°C при интенсивном встряхивании до достижения (OD_{600nm} 1,0 (типично 12-16 ч). Клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин, 4°C в течение 20 мин и ресуспендировали в 150 мл LB + карбенициллин (50 мкг/мл) + 0,5 мМ ИПТГ. После экспрессии в течение 5 ч при 30°C клетки осаждали путем центрифугирования при 4000 об/мин, 4°C в течение 20 мин, ресуспендировали в 10 мл буфера Bioscye HBS-EP и лизировали с использованием одного цикла замораживания (-80°C)/оттаивания (37°C). Клеточные лизаты осаждали путем центрифугирования 4000 об/мин, 4°C в течение 1 ч и супернатант собирали и фильтровали (0,2 мкм). Фильтрованные супернатанты наносили на колонки из сефарозы Ni-NTA superflow (Qiagen, Valencia, CA), уравновешенные в PBS, pH 8, затем промывали 5 объемами колонки PBS, pH 8. Индивидуальные Fab элюировали в различных фракциях PBS (pH 8) + 300 мМ имидазол. Фракции, содержащие Fab, объединяли и диализировали в PBS, затем количественно оценивали путем ELISA перед характеристической аффинности.

Препарат полноразмерного антитела. Для экспрессии полноразмерных антител переменные области тяжелой и легкой цепей клонировали в экспрессирующих векторах млекопитающих и трансфицировали с использованием липофектамина в клетки НЕК 293 для временной экспрессии. Антитела очищали с использованием белка А с использованием стандартных способов.

Вектор pDb.CGRP.hFcGI представляет собой экспрессирующий вектор, включающий тяжелую цепь антитела G1, и подходит для временной или стабильной экспрессии тяжелой цепи. Вектор pDb.CGRP.hFcGI имеет нуклеотидные последовательности, соответствующие следующим областям: области промотора мышинового цитомегаловируса (нуклеотиды 7-612); синтетического интрона (нуклеотиды 613-1679); области, кодирующей дегидрофолатредуктазу (ДФР) (нуклеотиды 688-1253); сигнальному пептиду человеческого гормона роста (нуклеотиды 1899-1976); переменной области тяжелой цепи G1 (нуклеотиды 1977-2621); константной области тяжелой цепи человеческого IgG2, содержащей следующие мутации: A330P331 на S330S331 (нумерация аминокислот со ссылкой на последовательность IgG2 дикого типа; см. Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624). Вектор pDb.CGRP.hFcGI депонирован в ATCC 15 июля 2005 г. и ему присвоен номер PTA-6867 в ATCC.

Вектор pEb.CGRP.hKGI представляет собой экспрессирующий вектор, включающий легкую цепь антитела G1 и подходящий для временной экспрессии легкой цепи. Вектор pEb.CGRP.hKGI имеет нуклеотидные последовательности, соответствующие следующим областям: области промотора мышинового цитомегаловируса (нуклеотиды 2-613); интрону человеческого EF-1 (нуклеотиды 614-1149); сигнальному пептиду человеческого гормона роста (нуклеотиды 1160-1237); легкой цепи переменной области антитела G1 (нуклеотиды 1238-1558); константной области человеческой цепи каппа (нуклеотиды 1559-1882).

Вектор pEb.CGRP.hKGI депонирован в ATCC 15 июля 2005 г. и ему присвоен номер PTA-6866 в ATCC.

Анализ Biacore для определения аффинности. Аффинности моноклонального антитела G1 и его вариантов определяли при 25 или 37°C с использованием системы поверхностно-плазмонного резонанса Biacore3000™ (SPR) (Biacore, INC, Piscaway NJ). Аффинность определяли путем связывания CGRP с биотинилированием по N-концу или фрагментов через предварительно иммобилизованный стрептавидин (сенсорный чип SA) и измерения кинетики связывания Fab фрагментов антитела G1 или вариантов путем титрования через CGRP или фрагмент на чипе. Все анализы Biacore проводили в буфере HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% об./об. полисорбата P20). Поверхности CGRP готовили путем разбавления N-биотинилированного CGRP до концентрации менее чем 0,001 мг/мл в буфере HBS-EP и его введения через сенсорный чип SA с использованием различных времен контакта. Для кинетических исследований высокого разрешения использовали поверхности с низкой емкостью, соответствующие уровню захвата <50 единиц реакции (RU), тогда как для исследования концентраций, отбора и определения аффинности раствора использовали поверхности с высокой емкостью (приблизительно 800 RU для захваченного CGRP). Кинетические данные получали путем серийного разведения Fab антитела G1 с двух- или трехкратным шагом до концентраций 1 мкМ-0,1 нМ (с целью получения оцененной 0,1-10× величины K_D). Образцы, как правило, вводили в течение 1 мин при 100 мкл/мин и оставляли по меньшей мере на 10 мин для диссоциации. После каждого цикла связывания поверхности регенерировали 25 mM NaOH в 25% об./об. этаноле, который выдерживал сотни циклов. Полные серии титрования (типично получаемые в двух параллелях) в общем подгоняли к модели связывания Лэнгмюра 1:1 с использованием программы оценки BIAevaluation. Это позволяло получить уникальную пару констант скоростей ассоциации и диссоциации (соответственно k_{on} и k_{off}) для каждого связывающего взаимодействия, причем это отношение позволило получить равновесную константу диссоциации ($K_D = k_{off}/k_{on}$). Определенные таким образом аффинности (значения K_D) представлены в табл. 6 и 7.

Высокоразрешающий анализ связывающих взаимодействий с экстремально низкими диссоциациями. Для взаимодействий с экстремально низкими диссоциациями (в частности, связывание Fab антитела G1 с человеческим α -CGRP на чипе при 25°C) аффинности определяли в двухстадийном эксперименте. Описанный выше протокол использовали со следующими модификациями. Константу скорости ассоциации (k_{on}) определяли путем введения в 2-кратных сериях титрования (в двух параллелях) от 550 до 1 нМ в течение 30 с при 100 мкл/мин и давали возможность для фазы диссоциации только 30 с. Константу скорости диссоциации (k_{off}) определяли путем введения трех концентраций (высокой, средней и низкой) в одних и тех же сериях титрования в двух параллелях в течение 30 с и давали возможность для фазы диссоциации в течение 2 ч. Аффинность (K_D) для каждого взаимодействия получали путем комбинирования значений k_{on} и k_{off} , полученных в обоих типах экспериментов, как показано в табл. 5.

Определение аффинности в растворе с использованием Biacore. Аффинность в растворе для антитела G1 в отношении крысиного α -CGRP и F37A (19-37) человеческого α -CGRP измеряли с использованием Biacore при 37°C. Использовали чип CGRP с высокой емкостью поверхности (для целей обнаружения выбран высокоаффинный человеческий α -GGRP) и буфер HBS-EP пропускали при 5 мкл/мин. Фрагмент Fab антитела G1 при постоянной концентрации 5 нМ (которая должна составлять ожидаемое значение K_D или меньше для взаимодействия в растворе) предварительно инкубировали с конкурентным пептидом крысиным α -CGRP или F37A (19-37) человеческого α -CGRP, в конечной концентрации от 1 нМ до 1 мкМ в трехкратных серийных разведениях. Растворы Fab антитела G1 в отсутствие или в присутствии конкурентного пептида в растворе вводили через CGRP на чип и контролировали уменьшение ответов в виде связывания, обнаруженных на поверхности чипа в результате конкуренции в растворе. Эти ответы в виде связывания превращали в "концентрации свободного Fab" с использованием калибровочной кривой, которую строили путем титрования одного Fab антитела G1 (5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,325 и 0 нМ) через CGRP на чипе. "Концентрации свободного Fab" откладывали на графике в зависимости от концентрации конкурентного пептида в растворе, используемого для получения каждой точки данных и подгонки к модели аффинности в растворе с использованием программного обеспечения BIAevaluation. Аффинности в растворе, определенные (опосредованно) таким образом, представлены в табл. 5 и 7 и использованы для подтверждения аффинностей, полученных при введении Fabs непосредственно через N-биотинилированный CGRP на чипе SA. Тесное соответствие между аффинностями, определенными этими двумя способами, подтверждает, что связывание N-биотинилированного варианта CGRP с чипом не меняет активности связывания нативного раствора.

В табл. 5 ниже показаны аффинности связывания антитела G1 с человеческим α -CGRP, человеческим β -CGRP, крысиным α -CGRP и крысиным β -CGRP, определенные с использованием Biacore путем пропуска фрагментов Fab через N-биотинилированные CGRP на чипе SA. Для лучшего определения аффинностей связывающих взаимодействий с экстремально низкими диссоциациями, аффинности также определяли в двухстадийном эксперименте для дополнения направленности данного анализа, также определяли аффинность в растворе взаимодействия крысиного α -CGRP (как описано выше). Тесное соответствие аффинностей, измеренных в обоих направлениях анализа, подтверждает, что аффинность связывания нативного крысиного α -CGRP в растворе не меняется, когда он подвергнут биотинилированию

по N-концу и связыванию с чипом SA.

Таблица 5

Аффинности связывания Fab антитела G1, титруемого через CGRP на чипе				
CGRP на чипе	Темп. (°C)	k_{on} (1/Me)	k_{off} (1/c)	K_D (нМ)
Человеческий α -CGRP	25	$1,86 \times 10^5$	$7,80 \times 10^{-6}$	0,042 (7%, n=4)*
Человеческий α -CGRP	37	$5,78 \times 10^5$	$3,63 \times 10^{-5}$	0,063 (4%, n=2)*
Человеческий β -CGRP	37	$4,51 \times 10^5$	$6,98 \times 10^{-5}$	0,155
Крысиный α -CGRP	25	$5,08 \times 10^4$	$6,18 \times 10^{-5}$	1,22(12%, n=2)*
Крысиный α -CGRP	37	$1,55 \times 10^5$	$3,99 \times 10^{-4}$	2,57* (раствор $K_D=10$ (50% n=4)**
Крысиный β -CGRP	37	$5,16 \times 10^5$	$7,85 \times 10^{-5}$	0,152

*Аффинности в отношении α -CGRP (крысиного и человеческого) определяли в высоко-разрешающем двухстадийном эксперименте, в котором фазу диссоциации контролировали в течение 2 ч (значения для k_{on} , k_{off} и K_D представляют среднее из n повторных экспериментов со стандартным отклонением, выраженным в виде процента дисперсии). Аффинности в отношении β -CGRP (крысиных и человеческих) определяли общим анализом с использованием только 20-минутной фазы диссоциации, которая не была достаточно точной для количественной оценки их экстремальных диссоциаций (их диссоциации вероятно медленнее, чем указанные здесь, и, таким образом, их аффинности вероятно выше). Fab антитела G1 чрезвычайно медленно диссоциировали из всех CGRP (за исключением крысиного α -CGRP) с диссоциациями, которые приближаются к пределу разделения для анализа Biacore (в особенности при 25°C).

**Аффинность в растворе определяли путем измерения уменьшения ответов в виде связывания, обнаруженных с использованием CGRP на чипе, для Fab антитела G1, предварительно инкубированного с конкурентным крысиным α -CGRP в растворе.

В табл. 6 ниже представлены антитела, имеющие отличие по аминокислотной последовательности по сравнению с антителом G1, и их аффинности в отношении крысиного α -CGRP и человеческого α -CGRP. Описаны все аминокислотные замены вариантов, представленных в табл. 6, относительно последовательности G1. Аффинности связывания фрагментов Fab определяли с использованием Biacore путем их пропускания через CGRP на чипе SA.

Аминокислотные последовательности и данные по аффинности связывания для вариантов антитела G1, определенные при 37°C с использованием Biorog

Клон	L1	L2	H2	HC-FW3	α -крысиный k_{off} (1/с)	α -крысиный K_D (нМ)	α -человеческий k_{off} (1/с)	α -человеческий K_D (нМ)
G1					$3,99 \times 10^{-4}$	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	$2,1 \times 10^{-4}$	1,7
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	н.о.	н.о.	$1,00 \times 10^{-5}$	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
M14				L99T A100K	н.о.	н.о.	$1,00 \times 10^{-5}$	0,06
M15				L99T A100P	$1,15 \times 10^{-3}$	63,9	$1,58 \times 10^{-5}$	0,10
M16				L99T A100S	$9,96 \times 10^{-4}$	55,3	$1,65 \times 10^{-4}$	1,03
M17				L99T A100V	$2,06 \times 10^{-3}$	114,4	$1,85 \times 10^{-4}$	1,16

M18				L99V A100G	1,22x10 ⁻³	67,8	7,03x10 ⁻⁵	0,44
M19				L99V A100R	н.о.	н.о.	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	76	1,4x10 ⁻⁴	1,3
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
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	L99T A100V	4,53x10 ⁻³	251,7	2,63x10 ⁻⁴	1,64

			S58C						
M44	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	$6,13 \times 10^{-3}$	443	$2,10 \times 10^{-4}$	2,05	
M45	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E E64D	L99T A100V	$5,58 \times 10^{-3}$	259	$2,11 \times 10^{-4}$	1,85	
M46	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E H61F	L99T A100V	$2,94 \times 10^{-3}$	163,3	$5,39 \times 10^{-4}$	3,37	
M47	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58G	L99T A100V	$8,23 \times 10^{-3}$	457,2	$3,32 \times 10^{-4}$	2,08	
M48	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58L	L99T A100V	0,0343	1905,6	$8,42 \times 10^{-4}$	5,26	
M49	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58Y H61F	L99T A100V	0,0148	822,2	$5,95 \times 10^{-4}$	3,72	
M50	R28N	G50A L56T	E54K A57R	L99T A100V	$5,30 \times 10^{-3}$	294,4	$4,06 \times 10^{-4}$	2,54	
M51	R28N	L56I	E54K A57G	L99T A100V	$1,18 \times 10^{-3}$	65,6	$1,31 \times 10^{-4}$	0,82	
M52	R28N	L56I	E54K A57N S58A	L99T A100V	$2,29 \times 10^{-3}$	127,2	$2,81 \times 10^{-4}$	1,76	
M53	R28N	L56I	E54K A57N S58G	L99T A100V	$1,91 \times 10^{-3}$	106,1	$3,74 \times 10^{-4}$	2,34	
M54	R28N T30A	G50A	E54K A57N S58P	L99T A100V	$2,16 \times 10^{-3}$	120,0	$1,79 \times 10^{-3}$	11,19	
M55	R28N T30A	L56S	E54K A57N S58E E64D	L99T A100V	$5,85 \times 10^{-3}$	325,0	$4,78 \times 10^{-4}$	2,99	
M56	R28N T30D	L56S	E54K A57N H61F	L99T A100V	$9,35 \times 10^{-3}$	519,4	$4,79 \times 10^{-4}$	2,99	
M57	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58E	L99T A100V	0,0104	1,200	$3,22 \times 10^{-4}$	3,08	
M58	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58I H61F	L99T A100V	Отсутствие связывания	н.о.	$1,95 \times 10^{-3}$	12,19	
M59	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58N H61F	L99T A100V	0,0123	683,3	$5,24 \times 10^{-4}$	3,28	
M60	R28N	L56S	E54K	L99T	0,0272	1511,1	$9,11 \times 10^{-4}$	5,69	

	T30D		A57N S58R H61F	A100V				
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	<u>5,75x10⁻³</u>	<u>242</u>	<u>5,57x10⁻⁴</u>	<u>5,86</u>
M63	R28N T30G	G50A	E54K A57N S58T	L99T A100V	2,65x10 ⁻³	147,2	1,50x10 ⁻³	9,38
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 A100 V	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
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	Отсутствие связывания	н.о.	9,33x10 ⁻⁴	5,83
M84	R28N T30V	A51H L56T	E54N A57N	L99T A100V	1,76x10 ⁻²	977,8	1,08x10 ⁻³	6,75

Все CDR включают CDR Кабата и Чотиа. Аминокислотные остатки пронумерованы последовательно (см. фиг. 5). Все клоны имеют последовательности L3+H1+H3, идентичные G1.

$K_D = k_{off}/k_{on}$. Все значения k_{off} определяли в режиме скрининга, за исключением подчеркнутых, которые получены путем общего анализа серий концентраций Fab (G1 анализировали в режиме высокого разрешения). Таким образом, подчеркнутые значения K_D определяли экспериментально путем измерения k_{on} . Оценили, что другие значения k_{on} являются такими же, как M25.

н.о. означает не определено

Для определения эпитопа на человеческом α -CGRP, распознаваемом антителом G1, использовали вышеописанные анализы ViaSage. Человеческий α -CGRP приобретен в виде N-биотинилированного варианта для того, чтобы дать возможность для его высокоаффинного захвата посредством сенсорного чипа SA. Определяли связывание фрагмента Fab G1 с человеческим α -CGRP на чипе в отсутствие или в присутствии пептида CGRP. Как правило, 2000:1 моль пептид/раствор Fab (например, 10 мкМ пептида в 50 нМ Fab G1) вводили через человеческий α -CGRP на чипе. На фиг. 6 представлен процент связывания, блокированного конкурирующим пептидом. Данные, представленные на фиг. 6, указывают на то, что пептиды, блокирующие 100% связывания Fab G1 с человеческим α -CGRP, представляют собой 1-37 (ДТ), 8-37, 26-37, P29A (19-37), K35A (19-37), K35E (19-37) и K35M (19-37) человеческого α -CGRP; 1-37 β -CGRP (ДТ); 1-37 крысиного α -CGRP (ДТ) и 1-37 крысиного β -CGRP (ДТ). Все эти пептиды амидированы по С-концу. Пептиды F37A (19-37) и 19-37 (последний не амидирован по С-концу) человеческого α -CGRP также блокировали приблизительно от 80 до 90% связывания Fab G1 с человеческим α -CGRP. Пептид 1-36 (не амидирован по С-концу) человеческого α -CGRP блокировал приблизительно 40% связывания Fab G1 с человеческим α -CGRP. Пептидный фрагмент 19-36 (амидирован по С-концу) человеческого α -CGRP; пептидные фрагменты 1-13 и 1-19 человеческого α -CGRP (ни один из которых не амидирован по С-концу); и человеческий амилин, кальцитонин и адреномедуллин (все амидированы по С-концу) не конкурировали за связывание Fab G1 с человеческим α -CGRP на чипе. Эти данные демонстрируют, что G1 нацелен на С-концевой эпитоп CGRP и что для связывания важны как идентичность самого последнего остатка (F37), так и его амидирование.

Также определяли аффинности связывания Fab G1 с вариантами человеческого α -CGRP (при 37°C). В табл. 7 ниже представлены аффинности, измеренные непосредственно путем титрования Fab G1 через N-биотинилированный человеческий α -CGRP, и варианты на чипе. Данные в табл. 7 указывают на то, что антитело G1 связывается с С-концевым эпитопом, причем F37 и G33 представляют собой наиболее важные остатки. G1 не связывается с CGRP, когда избыточный аминокислотный остаток (аланин) добавлен к С-концу (который является амидированным).

Таблица 7

Аффинности связывания Fab G1 с человеческим α -CGRP и вариантами, измеренные при 37°C
(см. табл. 4 в отношении их аминокислотных последовательностей)

CGRP на чипе	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_D (нМ)
1-37 (ДТ)	$4,68 \times 10^5$	$7,63 \times 10^{-5}$	0,16 (высокое разрешение $K_D=0,06$)
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 (раствор $K_D=172$ нМ)
38A (25-38A)	-	-	Связывание не обнаружено

Вышеприведенные данные указывают на то, что эпитоп, который связывает антитело G1, находится на С-конце человеческого α -CGRP, и аминокислоты 33 и 37 человеческого α -CGRP важны для связывания антитела G1. Кроме того, для связывания важно амидирование остатка F37.

Пример 5. Действие антагонистического антитела против CGRP G1 на расширение кровеносных сосудов в коже, вызванное путем стимуляции подкожного нерва крысы.

Для тестирования антагонистической активности антитела против CGRP G1 действие антител на расширение кровеносных сосудов кожи путем стимуляции подкожного нерва крысы тестировали с использованием крысиной модели, описанной в примере 3. Кратко, крыс поддерживали в состоянии ане-

стезии с 2% изофлураном. Бретилия тозилат (30 мг/кг, вводимый в.в.) давали в начале эксперимента для минимизации сужения кровеносных сосудов ввиду сопутствующей стимуляции симпатических волокон подкожного нерва. Температуру тела поддерживали при 37°C путем использования ректального зонда, термостатически связанного с контролируемым по температуре нагревающим одеялом. Подкожный нерв правой задней конечности извлекали хирургическим путем, проксимально надрезали и покрывали пластиковой оберткой для предотвращения высыхания. Лазерный доплеровский зонд помещали на медиодорсальную сторону кожи задней конечности, представляющей собой область, иннервируемую подкожным нервом. Кровоток в коже, измеренный в виде потока клеток крови, контролировали с использованием лазерного доплеровского измерителя потока. В экспериментах по определению действий антитела в течение 2 ч после инъекции через 30-45 мин после инъекции бретилия тозилата, когда устанавливался стабильный базовый поток (варьирование менее 5%) в течение по меньшей мере 5 мин, нерв помещали на платиновые биполярные электроды и подвергали электрической стимуляции (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с) и затем вновь через 20 мин. Средний ответ в виде кровотока для этих двух стимуляций использовали для оценки базового ответа (время 0) на электрическую стимуляцию. Затем внутривенно (в.в.) вводили антитело G1 (1 или 10 мг/кг) или разбавитель (PBS с 0.01% Tween 20, объем, равный 10 мг/кг G1). Нерв затем стимулировали (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с) через 30, 60, 90 и 120 мин после введения антитела. Животных поддерживали в состоянии анестезии в течение периода приблизительно 3 ч. Кумулятивное изменение кровотока в коже оценивали по площади под кривой зависимости потока от времени (AUC, эквивалентной изменению потока, умноженному на изменение времени) для каждого ответа в виде изменения потока на стимуляцию электрическим импульсом.

Как показано на фиг. 7, увеличение кровотока, стимулированное применением электрических импульсов на подкожный нерв, ингибировалось присутствием антитела G1 в количестве 1 мг/кг (вводимого в.в.) по сравнению с разбавителем, когда подкожный нерв электрически стимулировали через 90 мин после введения антитела. Увеличение кровотока, стимулированное путем применения электрических импульсов на подкожный нерв, значительно ингибировалось присутствием антитела G1 в количестве 10 мг/кг (вводимого в.в.) по сравнению с разбавителем, когда подкожный нерв электрически стимулировали через 90 и 120 мин после введения антитела.

В экспериментах по определению действий антител в более длительные моменты времени в анализе на подкожном нерве, крысам в.в. инъецировали указанные дозы антитела за 24 ч или 7 суток до подготовки животного к стимуляции подкожного нерва, как описано выше. В этих экспериментах невозможно было определить у отдельных крыс базовый ответ на стимуляцию электрическим импульсом перед введением дозы, так что группы, подвергнутые обработке, сравнивали с животными, которым вводили дозу разбавителя (PBS, 0,01% Tween 20) за 24 ч или 7 суток.

Как показано на фиг. 8А и 8В, кровоток, увеличенный в дорсо-медиальной области кожи задней конечности вследствие стимуляции подкожного нерва, значительно ингибировался в группах животных, которым вводили дозы 10 или 3 мг/кг G1 за 24 ч или 7 суток до стимуляции по сравнению с группами, которым вводили дозы разбавителя в те же моменты времени.

На фиг. 8С представлен анализ подгонки кривой, примененный в отношении данных зависимости доза-ответ, представленных на фиг. 8А и 8В, для определения дозы, требующейся для средней эффективной дозы (EC₅₀). EC₅₀ на 24 ч составляет 1,3 мг/кг, и EC₅₀ на 7 суток немного ниже (0,8 мг/кг).

Пример 6. Острый эффект антагонистического антитела против CGRP G1 в анализе на дуральной артерии (закрытое черепное окно).

Модель закрытого черепного окна: Задача данного эксперимента заключалась в определении острого эффекта антагонистических антител против CGRP и его сравнении с острым эффектом антагониста рецептора CGRP BIBN4096BS. Эксперименты осуществляли, как описано ранее (Williamson et al., *Cephalalgia* 17(4):518-24 (1997)) со следующими модификациями. Крыс Sprague Dawley (300-400 г) подвергали анестезии путем в.б. введения 70 мг/кг фенобарбитала. Анестезию поддерживали с использованием 20 мг/кг/ч в.в. фенобарбитала. Крысам через яремную вену вводили канюлю для доставки всех лекарств. Давление крови контролировали при помощи зонда (катетер с микронаконечником, Millar Instruments), вставленного через бедренную артерию в брюшную аорту. Крыс подвергали трахеотомии и частоту дыхания поддерживали на уровне 75 вдохов/мин при объеме 3,5 мл. После фиксации головы в стереотаксической установке и удаления кожи черепа готовили окно 2×6 мм в левой теменной области латерально к сагиттальному шву путем истончения кости при помощи бормашины. С использованием микроманипулятора платиновый биполярный электрод опускали на поверхность и покрывали тяжелым минеральным маслом. Латерально к окну электрода готовили и покрывали тяжелым минеральным маслом еще одно окно 5×6 мм, через которое непрерывно при помощи камеры с зарядовой связью (CCD) и видеонализатора плотности (Living Systems) контролировали диаметр ветви средней артерии мозговой оболочки (ММА). Крыс тестировали в течение по меньше 45 мин после подготовки. Оценивали базовый ответ на электрическую стимуляцию (15 В, 10 Гц, импульсы 0,5 мс, 30 с) и крысам затем в.в. вводили дозу экспериментального соединения (10 мг/кг mi7E9, 300 мкг/кг BIBN4096BS или PBS 0,01% Tween 20). Дополнительную электрическую стимуляцию осуществляли через 5 (BIBN4096BS), 30, 60, 90 и 120 мин после

введения дозы. Все данные регистрировали с использованием программного обеспечения для построения графиков (ADInstruments).

Как показано на фиг. 9, μ 7E9 в концентрации 10 мг/кг значительно блокирует расширение ММА, вызванное стимуляцией электрическим полем в течение 60 мин после введения дозы, и сохраняет этот эффект на протяжении всего анализа (120 мин). Для сравнения, BIBN4096BS блокирует расширение ММА в течение 5 мин после введения дозы, но этот эффект полностью исчезал в течение 90 мин. Величина блокирования была сравнима у BIBN4096BS и μ 7E9.

Пример 7. Длительный эффект антагонистического антитела против CGRP G1 в анализе дуральной артерии (закрытое черепное окно).

Задача этого эксперимента заключалась в определении того, может ли антитело против CGRP блокировать электрически стимулированное расширение ММА в течение 7 суток после введения дозы. Подготовка крыс была идентична вышеописанному эксперименту (пример 6) со следующими исключениями. Крысам в.в. инъецировали (10, 3 или 1 мг/кг G1) за 7 суток перед созданием закрытого черепного окна и стимуляцией. Невозможно было определить базовый ответ в виде расширения кровеносных сосудов на электрическую стимуляцию перед введением дозы как в вышеописанном эксперименте, так что группы, которым вводили антитело, сравнивали в отношении расширения ММА с контрольной группой, которой вводили дозу разбавителя (PBS, 0,01% Tween 20). После того как крыс оставляли не менее чем на 45 мин, твердую мозговую оболочку подвергали электрической стимуляции с 30-минутными интервалами. Стимуляции осуществляли импульсами 2,5, 5, 10, 15 и 20 В, все с частотой 10 Гц, длительностью 0,5 мс в течение 30 с.

Как показано на фиг. 10, G1 в концентрации 10 мг/кг и 3 мг/кг значительно блокировал расширение ММА, вызванное электрической стимуляцией в диапазоне от 10 до 20 В. Эти данные демонстрируют, что G1 может блокировать электрически стимулированное расширение ММА вплоть до 7 суток после введения дозы.

Пример 8. Модель "приливов" после отмены морфина.

Крысиная модель отмены морфина представляет собой общепринятую модель на грызунах для анализа механизмов прилива крови при менопаузе (Sipe et al., *Brain Res.* 1028(2): 191-202 (2004); Merchenthaler et al., *Maturitas* 30:307-316 (1998); Katovich et al., *Brain Res.* 494:85-94 (1989); Simpkins et al., *Life Sciences* 32:1957-1966 (1983)). В сущности у крыс вызывают привыкание к морфину путем имплантации морфиновых капсул под кожу. После возникновения привыкания животным инъецируют налоксон (опиоидный антагонист), который немедленно приводит их в абстинентное состояние. Это абстинентное состояние сопровождается повышением температуры кожи, снижением внутренней температуры тела, увеличением частоты пульса и увеличением концентрации в сыворотке крови лютеинизирующего гормона. Эти показатели по силе и времени протекания подобны тем, которые наблюдают при приливах крови у людей (Simpkins et al., *Life Sciences* 32:1957-1966 (1983)). Кроме того, если крыс обработать эстродиолом перед тем, как вызвать абстинентное состояние, симптомы приливов крови уменьшаются (Merchenthaler et al., *Maturitas* 30:307-316 (1998)). Полагают, что вследствие этого модель отмены морфина имитирует клиническую картину прилива крови.

Крысы, подвергнутые овариэктомии, приобретены в Charles River Laboratories. Не меньше чем через 7 суток после овариэктомии зависимости от морфина добывались путем подкожной имплантации морфиновой капсулы (75 мг морфинового основания). Через двое суток имплантировали еще 2 капсулы. На следующие сутки крысам внутривенно инъецировали 10 мг/кг 4901 [**] или разбавитель (PBS, 0,01% tween). Через двое суток после второго введения капсулы крыс подвергали анестезии кетамин (90 мг/кг) и слегка придерживали. Термопарный датчик для регистрации поверхностной температуры прикрепляли к основанию хвоста, а ректальный термопарный датчик использовали для измерения внутренней температуры. Данные регистрировали с использованием программного обеспечения Chart (ADInstruments). После регистрации стабильной базовой температуры в течение 15 мин подкожно инъецировали налоксон (1 мг/кг). Температуру регистрировали непрерывно в течение следующих 60 мин. Результаты представлены на фиг. 11А и 11В.

Понятно, что описанные здесь примеры и воплощения приведены только для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в их свете могут быть предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и объем данной заявки на изобретение. Все цитированные здесь публикации, патенты и заявки на патенты включены здесь для всех целей путем ссылки в том же объеме, как если бы для каждой индивидуальной публикации, патента или заявки на патент специфически и индивидуально было указано, что она включена путем ссылки.

Депонирование биологического материала.

Следующие материалы депонированы в Американской коллекции типовых культур, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, (JSA(ATCC)):

Материал	Антитело №	№ ATCC	Дата депонирования
pDb.CGRP.hFcGI	тяжелая цепь G1	PTA-6867	15 июля 2005
pEb.CGRP.hKGI	легкая цепь G1	PTA-6866	15 июля 2005

Вектор pEb.CGRP.hKGI предстает собой полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи к G1; и вектор pDb.CGRP.hFcGI представляет собой полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи G1 и константную область тяжелой цепи IgG2, содержащий следующие мутации: A330P331 на S330S331 (нумерация аминокислот со ссылкой на последовательность IgG2 дикого типа; см. Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624).

Эти депонирования сделаны в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры и инструкциями к нему (Будапештский договор). Это обеспечивает поддержание жизнеспособной культуры в органе по депонированию в течение 30 лет с даты депонирования. Депонирование сделано в ATCC по условиям Будапештского договора и является предметом соглашения между Rinat Neuroscience Corp. и ATCC, обеспечивающих постоянный и неограниченный доступ к потомству культуры в орган по депонированию лицам после выдачи соответствующего патента США или после выкладки заявки для опубликования любой заявки на патент США или иностранной заявки, в зависимости от того, какая будет опубликована первой, и обеспечивает доступ к потомству лица, определенному комиссаром по патентам и товарным знакам США как правомочное для этого в соответствии с 35 USC Section 122 и Commissioner's rules pursuant thereto (включая 37 CFR Section 1.14 с конкретной ссылкой на 886 OG 638).

Правопреемник настоящей заявки на патент согласен, что если культура материалов, находящихся в органе по депонированию, погибнет либо будет утрачена или разрушена при культивировании в подходящих условиях, материалы немедленно будут заменены на такие же по уведомлению. Доступность депонированного материала не следует рассматривать как лицензию на практическое применение изобретения в нарушение прав, предоставляемых органами власти в соответствии с патентными законами.

Последовательности антитела

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи G1 (SEQ ID NO: 1)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASATHYAEAVKG
 RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQGLVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи G1 (SEQ ID NO: 2)
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGIPARFSGSGSGTDF
 LTISSELPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIK

G1 CDR H1 (расширенный CDR) (SEQ ID NO: 3)
 GFTFSNYWIS

G1 CDR H2 (расширенный CDR) (SEQ ID NO: 4)
 EIRSESDASATHYAEAVKG

G1 CDR H3 (SEQ ID NO: 5)
 YFDYGLAIQNY

G1 CDR L1 (SEQ ID NO: 6)
 KASKRVTTYVS

G1 CDR L2 (SEQ ID NO: 7)
 GASNRYL

G1 CDR L3 (SEQ ID NO: 8)
 SQSYNYPYT

Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи G1 (SEQ ID NO: 9)

GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCTGCGTCTGCTCCTGC
 GCTGCTCCGGTTTCACCTTCTCCAACCTACTGGATCTCCTGGGTTTCGTCAGGCTCCTGGTAAAGGTCT
 GGAATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCGAATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTAA
 GGTGCTTTCACCATCTCCCGTGACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACCTCCTGCGTG
 CTGAAGACACCGCTGTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGTCTGGCTATCCAGAACCTACTGG
 GGTACGGGTACCCTGGTTACCGTTTCCTCC

Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи G1 (SEQ ID NO: 10)
 GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCTGTCCCTGTCCCAGGTGAACGTGCTACCCTGTCTCTGC
 AAAGCTTCCAACGGGTTACCACCTAGTTTCTGGTACCAGCAGAAACCCGGTTCAGGCTCCTCGTCTG
 CTGATCTACGGTGTCTCAACCGTTACCTCGGTATCCCAGCTCGTTTCTCCGGTTCGGTTCGGTACCG
 ACTTACCCTGACCATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTACTACTGCAGTCAGTCTCTACAA
 CTACCCCTACACCTTCGGTACGGGTACCAAACCTGGAATCAAA

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи полноразмерного антитела G1 (включающего описанный здесь модифицированный IgG2) (SEQ ID NO: 11)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASATHYAEAVKGR
 FTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS
 TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDH
 KPSNTKVDKTVKRCCEVCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQV
 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность легкой цепи полноразмерного антитела G1 (SEQ ID NO: 12)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGIPARFSGSGSGTD
 FTLTISSLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYP
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
 NRGEC

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи полноразмерного антитела G1 (включающего описанный здесь модифицированный IgG2) (SEQ ID NO: 13)

GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTCCCTGCGTCTGCCTGC
 GCTGCTCCGGTTTCACCTTCTCCAACACTACTGGATCTCCTGGGTTCGTGAGGCTCCTGGTAAAGGTC
 TGGAATGGGTGCTGAAATCCGTTCCGAATCCGACCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTAA
 AGGTGCTTTCACCATCTCCCGTGACAACGCTAAGAAGTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGT
 GCTGAAGACACCGCTGTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGTCTGGCTATCCAGAAGTACTG
 GGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCTCCGCTCCACCAAGGGCCCATCTGTCTCCCACTGGC
 CCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
 AGAACCTGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCAGCTGT
 CCTGCAGTCTCAGGTCTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGCAC
 CCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCAAGCAACCAAGGTCGACAAGACCGTGGAGAG
 AAAGTGTGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGCCCCTCAGTGGCCGGACCATCCGTGTTCTGTTC
 CCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCCAGAACCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGAC
 GTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCC
 AAGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTTCCAGAGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGGT
 CACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGC
 ATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGACGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATACCCTGCCCCCA
 TCCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCG
 ACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGAGAACAACATAAGACCACCCTCCAATGC
 TGGACTCCGACGGATCCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGG
 AAACGTGTTCTTCTTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGAGCCTGTCC
 CTGTCTCCAGGAAAGTAA

Нуклеотидная последовательность легкой цепи полноразмерного антитела G1 (SEQ ID NO: 14)

GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCAAGTGAACGTGTACCCTGTCTCCT
 GCAAAGCTTCCAAACGGGTACCACCTACGTTTCTGGTACCAGCAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCG
 TCTGCTGATCTACGGTGTCTCCAACCGTTACCTCGGTATCCAGCTCGTTTCTCCGGTCCGGTCC
 GGTACCGACTTACCCTGACCATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTC
 AGTCCATAAAGTACCCTACACCTTCGGTCAGGGTACCAAACTGGAAATCAAACGCACTGTGGCTGC
 ACCATCTGTCTTCTATCTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCGGAAGTGCCTCTGTTGTGGC
 TGCTGAATAACTTCTATCCGCGCAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCG
 GTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC
 TGACCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC
 TGAGTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGCTAA

Сравнение аминокислотной последовательности человеческого и крысиного CGRP (человеческий α -CGRP (SEQ ID NO: 15); человеческий β -CGRP (SEQ ID NO: 43); крысиный α -CGRP (SEQ ID NO: 41) и крысиный β -CGRP (SEQ ID NO: 44)):

NH₂-ACD^TTATCVTHRLAGLLSRSGGVVK^NNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (человеческий α-CGRP)

NH₂-AC^NTATCVTHRLAGLLSRSGGM^VVKS^NNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (человеческий β-CGRP)

NH₂-SC^NTATCVTHRLAGLLSRSGGVK^DDNFVPTNVGSEAF-CONH₂ (крысиный α-CGRP)

NH₂-SC^NTATCVTHRLAGLLSRSGGVK^DDNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (крысиный β-CGRP)

Перечень последовательностей

<110> Ринат Ньюросайенс Корп.
Зеллер, Джоэрг
Поулсен, Кристиан
Абдич, Ясмин
Понс, Хауме
Сьерра, Джонс
Розенталь, Арнон

<120> Антагонистические антитела против пептида, связанного с геном кальцитонина, и способы их применения

<130> PC19499A

<160> 47

<170> PatentIn версия 3.3

<210> 1

<211> 122

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела

<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> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область легкой цепи гуманизированного антитела

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Lys Arg Val Thr Thr Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 3

<211> 10

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR H1 гуманизированного антитела

<400> 3

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

<210> 4

<211> 19

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR H2 гуманизированного антитела

<400> 4

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

Val Lys Gly

<210> 5
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR H3 гуманизированного антитела

<400> 5

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

<210> 6
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR L1 гуманизированного антитела

<400> 6

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

<210> 7
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR L2 гуманизированного антитела

<400> 7

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Leu
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR L3 гуманизированного антитела

<400> 8

Ser Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 366
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Варибельная область тяжелой цепи гуманизованного антитела

<400> 9
 gaagttcagc tggttgaatc cgggtggtgt ctggttcagc caggtggttc cctgogtctg 60
 tcttgcgctg cttccggttt cacctctcc aactactgga tctctgggt tctcaggct 120
 cctggtaaag gtctggaatg ggttgctgaa atccgttccg aatccgacgc gtccgctacc 180
 cattacgctg aagctgttaa aggtcgtttc accatctccc gtgacaacgc taagaactcc 240
 ctgtacctgc agatgaaactc cctgogtctg gaagacaccg ctgtttacta ctgectggct 300
 tactttgact acggtctggc tatccagaac tactggggtc aggtaccct ggttaccgtt 360
 tctccc 366

<210> 10
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Варибельная область легкой цепи гуманизованного антитела

<400> 10
 gaaatcgttc tgaccagtc cccggctacc ctgtccctgt cccaggtga acgtgctacc 60
 ctgtcctgca aagcttccaa acgggttacc acctacgttt cctggtagca gcagaaacc 120
 ggtcaggctc ctcgtctgct gatctacggt gttccaacc gttacctcgg tatcccagct 180
 cgtttctccg gttccggttc cggtagcagc ttcaccctga ccatctctc cctggaacc 240
 gaagacttcg ctgtttacta ctgcagtcag tctacaact accctacac ctctggtcag 300
 ggtaccsaac tggaatcaa a 321

<210> 11
 <211> 448
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полноразмерная тяжелая цепь гуманизованного антитела

<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

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> ДНК
- <213> Искусственная последовательность

- <220>
- <223> Полноразмерная тяжелая цепь гуманизированного антитела

<400> 13
 gaagttcagc tggttgaatc cgggtggtgt ctggttcagc caggtggttc cctgcgtctg 60
 tcctgcgctg cttccggttt cacctctctcc aactactgga tctcctgggt tcgtcaggct 120
 cctggtaaag gtctggaatg ggttgctgaa atccgttccg aatccgacgc gtcgctacc 180
 cattacgctg aagctgttaa aggtcgtttc accatctccc gtgacaacgc taagaactcc 240
 ctgtacctgc agatgaactc cctgcgtgct gaagacaccg ctgtttacta ctgcctggct 300
 tactttgact acggtctggc tatccagaac tactggggtc aggttacctt ggttaccggt 360
 tcctccgcct ccaccaaggg cccatctgtc ttcccactgg cccatgctc ccgcagcacc 420
 tccgagagca cagccgcctt gggctgctg gtcaaggact acttcccaga acctgtgacc 480
 gtgtcctgga actctggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctgcag 540

tctcaggtc tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc catccagcaa cttcggcacc	600
cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag ccaagcaaca ccaaggtcga caagaccgtg	660
gagagaaagt gttgtgtgga gtgtccacct tgtccagccc ctccagtggc cggaccatcc	720
gtgttctgt tccctccaaa gccaaaggac accctgatga tctccagaac cccagaggtg	780
acctgtgtgg tgggtggacgt gtcccacgag gaccagagg tgcaattcaa ctggtatgtg	840
gacggagtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagccaagag aggagcagtt caactccacc	900
ttcagagtgg tgagcgtgct gaccgtggtg caccaggact ggctgaacgg aaaggagtat	960
aagtgtaagg tgtccaacaa gggactgcc aaccagcatc agaagacat ctccaagacc	1020
aagggacagc caagagagcc acaggtgtat accctgcccc catccagaga ggagatgacc	1080
aagaaccagg tgtccctgac ctgtotggtg aagggattct atccatccga catcgcogtg	1140
gagtgggagt ccaacggaca gccagagaac aactataaga ccaacctcc aatgctggac	1200
tccgacgat ccttcttct gtattccaag ctgaccgtgg acaagtccag atggcagcag	1260
ggaaacgtgt tctcttgttc cgtgatgcac gaggcctgc acaaccacta taccagaag	1320
agcctgtccc tgtctccagg aaagtaa	1347

<210> 14
 <211> 645
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полноразмерная легкая цепь гуманизированного антитела

<400> 14

gaaatcgttc tgaccsagtc cccggctacc ctgtccctgt cccaggtga acgtgctacc	60
ctgtcctgca aagcttccaa acgggttacc acctacgttt cctggtacca gcagaaacc	120
ggtcaggctc ctcgctgct gatctacggt gcttccaacc gttacctcg tatcccagct	180
cgtttctccg gttccggttc cggtagcgac ttcacctga ccatctctc cctggaacc	240
gaagacttcg ctgtttacta ctgcagtcag tctacaact accctacac cttcggtcag	300
ggtaccaaac tggaaatcaa acgcaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttccctcca	360
tctgatgagc agttgaaatc cggaaactgcc tctgttgtgt gctgctgaa taacttctat	420
ccgcgcgagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatccg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gctcagcag caccctgacc	540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gegaagtcac ccatcagggc	600
ctgagttctc cagtcacaaa gagcttcaac cgcgggtgagt gctaa	645

<210> 15
 <211> 37
 <212> ПРТ

<213> человек

<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> ПРТ

<213> человек

<400> 16

Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu Ser Arg Ser Gly Gly Val Val
1 5 10 15

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

<210> 17

<211> 19

<212> ПРТ

<213> человек

<400> 17

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

Lys Ala Phe

<210> 18

<211> 19

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариант фрагмента человеческого альфа-CGRP

<400> 18

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

Lys Ala Phe

<210> 19
 <211> 19
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 19

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

Ala Ala Phe

<210> 20
 <211> 19
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 20

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

Glu Ala Phe

<210> 21
 <211> 19
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 21

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

Met Ala Phe

<210> 22
 <211> 19
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 22

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

Gln Ala Phe

<210> 23

<211> 19

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 23

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

Lys Ala Ala

<210> 24

<211> 14

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 24

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

<210> 25

<211> 13

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Фрагмент человеческого альфа-CGRP

<400> 25

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

<210> 26

<211> 13

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 26

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

<210> 27
 <211> 13
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 27

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

<210> 28
 <211> 13
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 28

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

<210> 29
 <211> 13
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 29

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

<210> 30
 <211> 13
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 30

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

<210> 31
 <211> 13
 <212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 31

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

<210> 32

<211> 13

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 32

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

<210> 33

<211> 13

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 33

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

<210> 34

<211> 13

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Фрагмент, вариант человеческого альфа-CGRP

<400> 34

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

<210> 35

<211> 12

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Фрагмент человеческого альфа-CGRP

<400> 35

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

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> фрагмент человеческого альфа-CGRP

<400> 39

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

Ser Arg Ser

<210> 40

<211> 13

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> фрагмент человеческого альфа-CGRP

<400> 40

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

<210> 41

<211> 37

<212> ПРТ

<213> Крыса

<400> 41

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

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

Gly Ser Glu Ala Phe
35

<210> 42

<211> 19

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> фрагмент крысиного альфа-CGRP

<400> 42

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

Glu Ala Phe

<210> 43
 <211> 37
 <212> ПРТ
 <213> Человек

<400> 43

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

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

Gly Ser Lys Ala Phe
 35

<210> 44
 <211> 37
 <212> ПРТ
 <213> Крыса

<400> 44

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

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

Gly Ser Lys Ala Phe
 35

<210> 45
 <211> 32
 <212> ПРТ
 <213> Человек

<400> 45

Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe
 1 5 10 15

Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
 20 25 30

<210> 46
 <211> 37
 <212> ПРТ
 <213> Человек

<400> 46

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 47
 <211> 52
 <212> ПРТ
 <213> Человек

<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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антагонистическое антитело против CGRP, обладающее аффинностью связывания (K_D) с человеческой α -формой пептида, связанного с геном кальцитонина (α -CGRP), составляющей 50 нМ или менее, измеренной с использованием поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, где указанное антитело содержит:

а) V_H CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 5 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 5 по 1 или 2 консервативным аминокислотным заменам; и

б) V_L CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 8 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 8 по 1 или 2 консервативным аминокислотным заменам.

2. Антагонистическое антитело против CGRP по п.1, которое связывается с С-концевым фрагментом, имеющим аминокислоты 25-37 CGRP.

3. Антагонистическое антитело против CGRP по п.2, которое связывается с С-концевым эпитопом в пределах аминокислот 25-37 CGRP.

4. Антитело по любому из пп.1-3, дополнительно содержащее по меньшей мере один гипервариабельный участок (CDR), выбранный из группы, состоящей из:

в) CDR H1 с последовательностью SEQ ID NO: 3;

г) CDR H2 с последовательностью SEQ ID NO: 4;

д) CDR L1 с последовательностью SEQ ID NO: 6;

е) CDR L2 с последовательностью SEQ ID NO: 7 и

ж) варианты L1, L2 и H2, как представлено в табл. 6.

5. Антитело по любому из пп.1-4, содержащее домен V_H , который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и домен V_L , который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

6. Антитело по п.5, где аминокислотный остаток в положении 99 в SEQ ID NO: 1 представляет собой L или замещен A, N, S, T, V или R и где аминокислотный остаток в положении 100 в SEQ ID NO: 1 представляет собой A или замещен L, R, S, V, Y, C, G, T, K или P.

7. Антитело по любому из пп.1-6, представляющее собой молекулу IgG, IgM, IgE, IgA или IgD или их производное.

8. Антитело по любому из пп.1-7, содержащее тяжелую цепь, продуцируемую экспрессирующим вектором, имеющим номер РТА-6867 в Американской коллекции типовых культур (ATCC).

9. Антитело по любому из пп.1-7, содержащее легкую цепь, продуцируемую экспрессирующим вектором, имеющим номер РТА-6866 в ATCC.

10. Антитело по любому из пп.1-9, состоящее из последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 12.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

12. Применение антагонистического антитела против CGRP по любому из пп.1-10 для профилактики или лечения мигрени с аурой или без нее, гемиплегической мигрени, кластерной головной боли, мигренозной невралгии, хронической головной боли или головной боли напряжения.

13. Применение антагонистического антитела против CGRP по любому из пп.1-10 в изготовлении лекарственного средства для профилактики или лечения мигрени с аурой или без нее, гемиплегической мигрени, кластерной головной боли, мигренозной невралгии, хронической головной боли или головной боли напряжения.

14. Выделенный полинуклеотид, включающий полинуклеотид, кодирующий антитело G1, содержащее тяжелую и легкую цепь, как они определены в п.10, или его варианты, представленные в табл. 6, или его фрагмент.

15. Выделенный полинуклеотид по п.14, где фрагмент выбран из:

(а) легкой цепи антитела G1,

(б) тяжелой цепи антитела G1,

(в) фрагмента, содержащего одну или более чем одну вариабельную область легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1,

(г) фрагмента, содержащего любую одну, две, три, четыре, пять или шесть областей, определяющих комплементарность, легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1.

16. Выделенный полинуклеотид по п.14, включающий любой или оба полинуклеотида с последовательностями SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14.

17. Выделенный полинуклеотид по п.14, включающий любой или оба полинуклеотида с последовательностями SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

18. Вектор, включающий полинуклеотид по любому из пп.14-17.

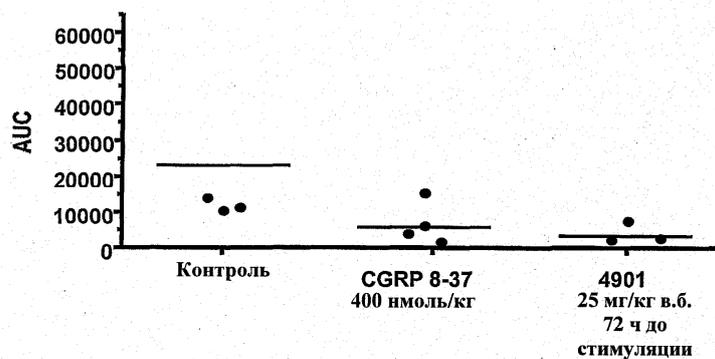
19. Вектор по п.18, депонированный как ATCC № 6867 или как ATCC № 6866.

20. Клетка-хозяин, включающая полинуклеотид по любому из пп.14-17 или вектор по любому из пп.18 или 19.

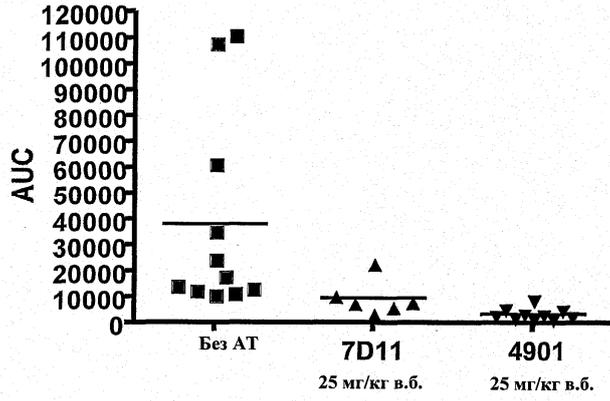
21. Способ получения антитела G1, содержащего тяжелую и легкую цепь, как они определены в п.10, или его вариантов, представленных в табл. 6, или его фрагмента, включающий стадии (а) экспрессии полинуклеотида по любому из пп.14-17 или вектора по любому из пп.18 или 19 в подходящей клетке-хозяине и, при необходимости, (б) извлечения и/или выделения указанного антитела или его фрагмента.

Fab	K _D (нМ)	K _D (нМ)	K _D (нМ)	K _D (мутант/родитель)									
				F27A	V28A	P29A	T30A	N31A	V32A	G33A	S34A	K35A	F37A
7E9	1.0	1.1±0.8	0.14±0.05	1.0	1.0	26	7	9	41	1256	69	4	3598
8B6	1.1	1.5±1.2	0.45±0.08	1.0	1.0	9	2.2	3	5	496	26	3	2527
10A8	2.1	2.4±1.4	1.0±0.2	1.0	1.0	9	4	4	11	36	82	13	2152
7D11	4.4	10±7	3.4±0.4	1.1	1.0	7	4	5	5	86	18	1.4	420
6H2	9.3	7.8±0.2	8.5±0.5	0.9	1.0	1.0	0.8	4	11	14	0.5	1.0	
4901	60.5	52±12	296±115	0.8	0.8	0.2	0.2	0.3	0.9	1.3	0.8	0.3	
14E10	79.7	91±3	117.4±0.7	0.8	0.8	11	3	18	2	1	3	0.4 ^b	
9B8	84.7	76±20	96±28	0.8	0.8	0.6	0.6	0.7	0.6	1.3	4	0.4 ^b	
13C2	94.4	86±13	137±5	0.7	0.7	0.5	0.4	0.6	0.2	0.9	1.1	0.4 ^b	
14A9	148.4	219±114	246±20	0.8	0.7	0.7	0.5	0.8	0.7	1.6	1.3	6	
6D5	209.9	207±26	378±22	0.8	0.7	0.5	0.4	0.6	0.5	3	1.1	5	
1C5	296.4	223±51	430±173	0.8	0.8	0.6	0.4	0.6	0.6	1.1	1.1	5	

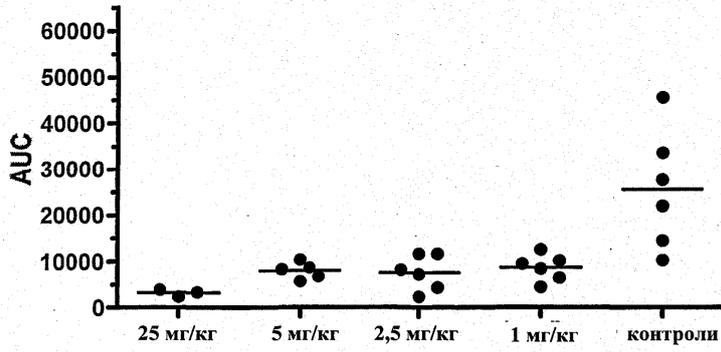
Фиг. 1



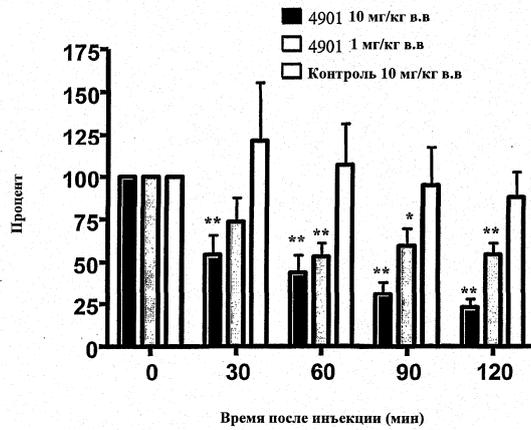
Фиг. 2А



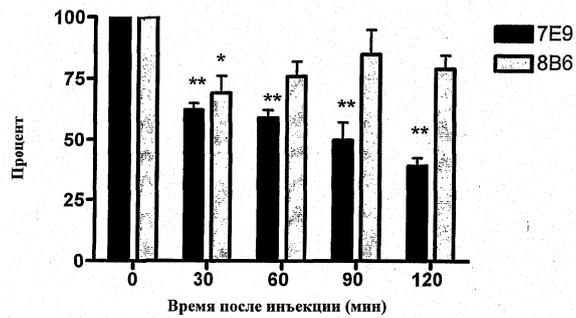
Фиг. 2В



Фиг. 3



Фиг. 4А



Фиг. 4В

Жирный = CDR Кабата
 Подчеркнутый = CDR Чотиа

Тяжелая цепь G1

```

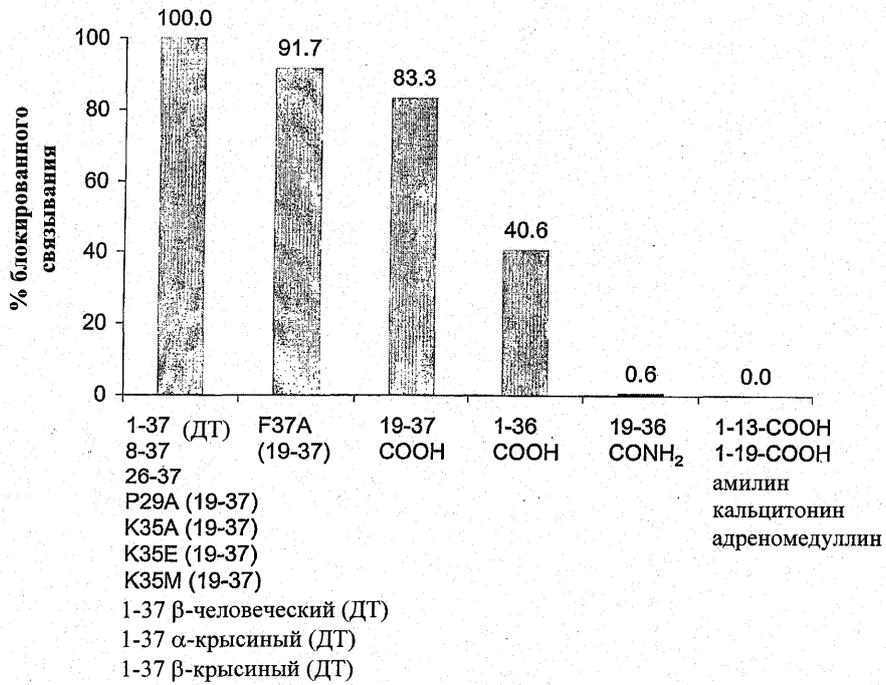
1           5           10          15          20          25          30
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S      H1
31          35          40          45          50          55          60
N Y W I S W V R Q A P G K G L E W V A E I R S E S D A S A T      H2
61          65          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
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      H3
121 122
S S
    
```

Легкая цепь G1

```

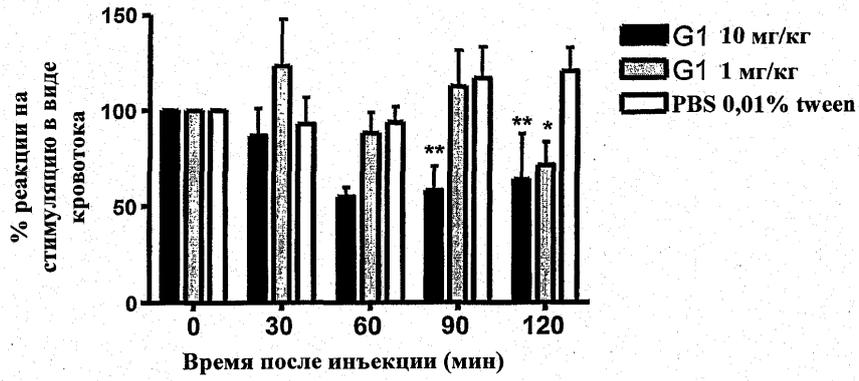
1           5           10          15          20          25          30
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C K A S K R V T      L1
31          35          40          45          50          55          60
T Y V S W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S N R Y L G I P A      L2
61          65          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
S Y N Y P Y T F G Q G T K L E I K      L3
    
```

Фиг. 5

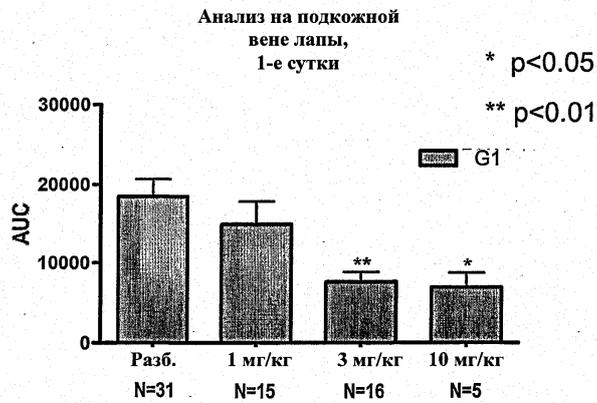


Конкурентные пептиды

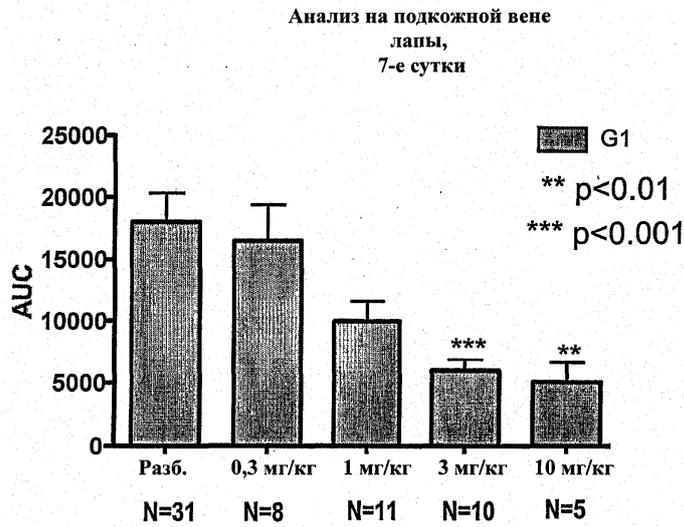
Фиг. 6



Фиг. 7

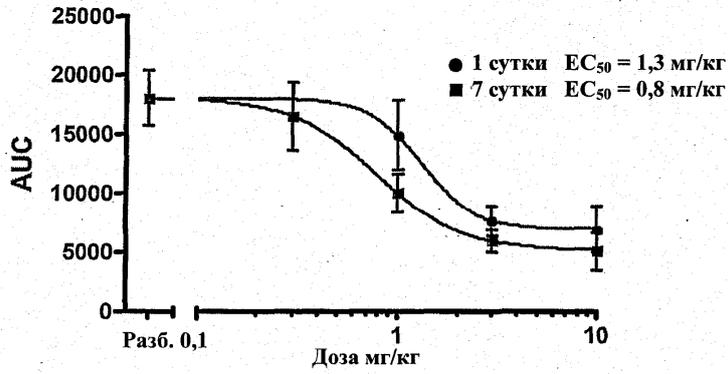


Фиг. 8А

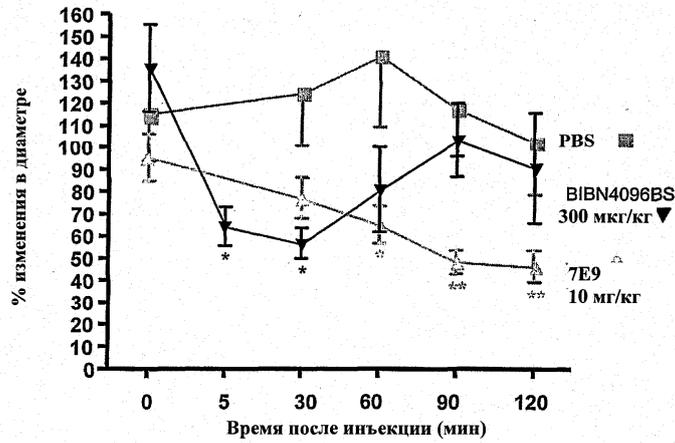


Фиг. 8В

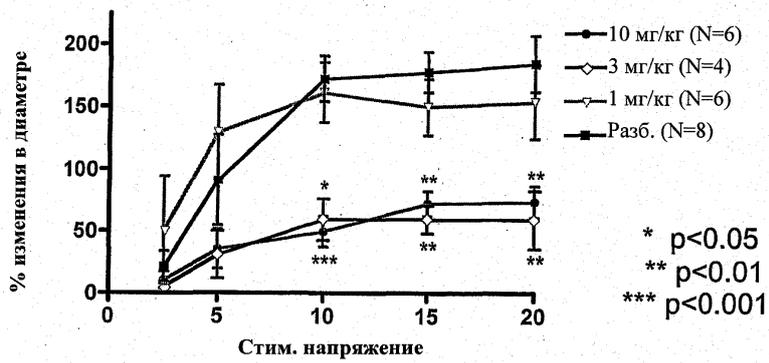
Анализ на подкожной вене
лапы
Антитело G1
Зависимость доза-ответ



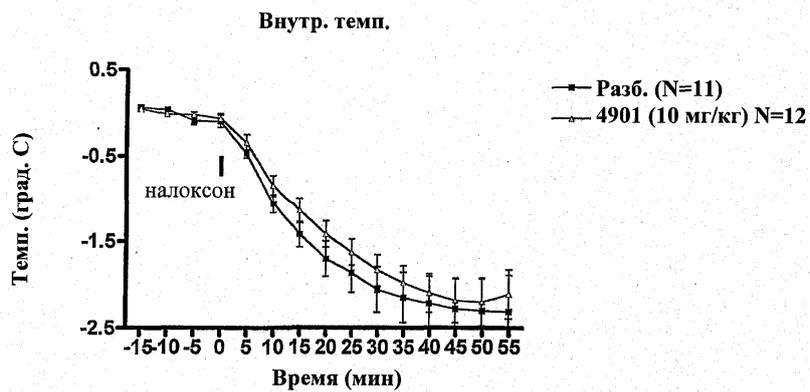
Фиг. 8С



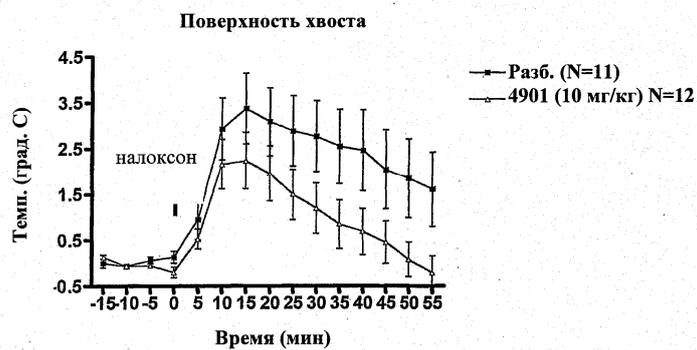
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11А



Фиг. 11В

