



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103421114 B

(45)授权公告日 2017.09.22

(21)申请号 201210315699.1

(22)申请日 2006.11.02

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103421114 A

(43)申请公布日 2013.12.04

(30)优先权数据

60/736,623 2005.11.14 US

(62)分案原申请数据

200680042443.0 2006.11.02

(83)生物保藏信息

ATCC PTA-6866 2005.07.15

ATCC PTA-6867 2005.07.15

(73)专利权人 莱布瑞斯生物公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 乔格·泽勒

克里斯顿·托德·波尔森

雅斯米纳·杜比亚·阿迪石

尧姆·庞斯

西尔若·琼斯·库利尔

安依·露森达尔

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 肖善强

(51)Int.Cl.

C07K 16/26(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

A61P 25/06(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1308676 A, 2001.08.15, 全文.

CN 1671711 A, 2005.09.21, 全文.

审查员 潘浩

权利要求书3页 说明书56页

序列表14页 附图10页

(54)发明名称

针对降钙素基因相关肽的拮抗剂抗体及其
使用方法

(57)摘要

本申请涉及针对降钙素基因相关肽的拮抗剂抗体及其使用方法。本发明描述了通过施用抗CGRP拮抗剂抗体来预防或治疗CGRP相关病症如血管运动症状的方法,所述病症包括头痛(例如偏头痛、丛集性头痛和紧张性头痛)和热潮红。也描述了针对CGRP的拮抗剂抗体G1和来自G1的抗体。

Fab	K _D (nM)	K _D (nM)	K _D (nM)	K _D (突变体/载体)									
				P27A	V28A	P29A	T30A	N31A	V32A	G33A	S34A	K35A	F37A
TE9	1.0	1.1±0.8	0.14±0.05	1.0	1.0	26	7	56	31	1256	69	4	3598
SB6	1.1	1.5±1.2	0.45±0.08	1.0	1.0	9	2.2	3	3	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	8	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	0.8	0.8	1.4	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	0.2	0.2	0.2	0.2	1	0.3	0.4	
9B8	84.7	76±20	96±28	0.8	0.8	0.6	0.6	0.7	0.6	1.3	0.4	0.4	
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	
14A9	148.4	219±114	246±20	0.8	0.7	0.7	0.5	0.8	0.7	1.6	1.3	1.6	
6D5	209.9	207±26	378±22	0.8	0.7	0.5	0.4	0.6	0.5	3.5	1.1	5	
1C5	296.4	223±51	430±73	0.8	0.8	0.6	0.4	0.6	0.6	1.1	1.1	5	

1. 对人 α -CGRP具有50nM或更小 K_D 的经分离的人或人源化的抗CGRP拮抗剂抗体,所述亲合力通过表面等离子共振在37°C下测量,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体包含:

- a. SEQ ID NO:3示出的CDR H1;
- b. SEQ ID NO:4示出的CDR H2;
- c. SEQ ID NO:5示出的CDR H3;
- d. SEQ ID NO:6示出的CDR L1;
- e. SEQ ID NO:7示出的CDR L2;以及
- f. SEQ ID NO:8示出的CDR L3。

2. 如权利要求1所述的抗CGRP拮抗剂抗体,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体结合具有CGRP的氨基酸25-37的C末端片段。

3. 如权利要求1所述的抗CGRP拮抗剂抗体,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体结合CGRP的氨基酸25-37中的C末端表位。

4. 权利要求1所述的抗CGRP拮抗剂抗体,其中所述抗体为IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子,或从其衍生而来。

5. 如权利要求1所述的抗CGRP拮抗剂抗体,其中所述抗体包含Fc区。

6. 如权利要求5所述的抗CGRP拮抗剂抗体,其中所述Fc区包含受损的效应子作用。

7. 如权利要求1所述的抗CGRP拮抗剂抗体,其中所述抗体是人源化的抗体。

8. 包含根据权利要求1所述的抗体和可药用的赋形剂的药物组合物。

9. 如权利要求1所述的抗CGRP拮抗剂抗体,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体被配制为用于全身性施用。

10. 有效量的抗CGRP拮抗剂抗体用于制备在个体中治疗头痛的药物中的用途,其中(i)所述抗CGRP拮抗剂抗体是人单克隆抗体或人源化的单克隆抗体;(ii)所述抗CGRP拮抗剂抗体对人 α -CGRP具有50nM或更小 K_D ,所述亲合力通过表面等离子共振在37°C下测量;和(iii)所述抗CGRP拮抗剂抗体结合具有人 α -CGRP的氨基酸19-37的C末端片段,

其中所述抗CGRP拮抗剂抗体包含:

- a. SEQ ID NO:3示出的CDR H1;
- b. SEQ ID NO:4示出的CDR H2;
- c. SEQ ID NO:5示出的CDR H3;
- d. SEQ ID NO:6示出的CDR L1;
- e. SEQ ID NO:7示出的CDR L2;以及
- f. SEQ ID NO:8示出的CDR L3。

11. 如权利要求10所述的用途,其中所述个体是人。

12. 如权利要求10所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体结合具有CGRP的氨基酸25-37的C末端片段或CGRP的氨基酸25-37中的C末端表位。

13. 如权利要求10所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体包含具有受损的效应子作用的Fc区。

14. 如权利要求10所述的用途,其中所述药物被制备用于全身性、静脉内、皮下、肌肉或经皮施用。

15. 如权利要求10所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体包含源自人IgG2恒定区的

重链恒定区。

16. 如权利要求10所述的用途,其中所述药物还包含可药用的运载体、赋形剂和/或稳定剂。

17. 如权利要求10所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体是人源化的单克隆抗体。

18. 如权利要求10所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体被配制为用于以3 μ g/kg到100mg/kg的用量施用。

19. 如权利要求10所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体降低CGRP受体的CGRP生物活性。

20. 如权利要求10所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体是人单克隆抗体。

21. 如权利要求10所述的用途,其中所述头痛是有先兆或无先兆的偏头痛。

22. 如权利要求10所述的用途,其中所述头痛是偏瘫性偏头痛。

23. 如权利要求10所述的用途,其中所述头痛是丛集性头痛。

24. 如权利要求10所述的用途,其中所述头痛是偏头痛神经痛。

25. 如权利要求10所述的用途,其中所述头痛是久头痛。

26. 如权利要求10所述的用途,其中所述头痛是紧张性头痛。

27. 如权利要求10所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体阻断CGRP与其受体结合。

28. 如权利要求10所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体阻断对CGRP的细胞应答的激发。

29. 如权利要求10所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体阻断CGRP受体激活。

30. 如权利要求10所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体为IgG、IgM、IgE、IgA、IgD分子,或从其衍生而来。

31. 有效量的抗CGRP拮抗剂抗体用于制备在个体中减少头痛发作的药物中的用途,其中(i)所述抗CGRP拮抗剂抗体是人单克隆抗体或人源化的单克隆抗体;(ii)所述抗CGRP拮抗剂抗体对人 α -CGRP具有50nM或更小 K_D ,所述亲和力通过表面等离子共振在37 $^{\circ}$ C下测量;和(iii)所述抗CGRP拮抗剂抗体结合具有人 α -CGRP的氨基酸19-37的C末端片段,

其中所述抗CGRP拮抗剂抗体包含:

a. SEQ ID NO:3示出的CDR H1;

b. SEQ ID NO:4示出的CDR H2;

c. SEQ ID NO:5示出的CDR H3;

d. SEQ ID NO:6示出的CDR L1;

e. SEQ ID NO:7示出的CDR L2;以及

f. SEQ ID NO:8示出的CDR L3。

32. 如权利要求31所述的用途,其中所述个体是人。

33. 如权利要求31所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体结合具有CGRP的氨基酸25-37的C末端片段或CGRP的氨基酸25-37中的C末端表位。

34. 如权利要求31所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体包含具有受损的效应子作用的Fc区。

35. 如权利要求31所述的用途,其中所述药物被制备用于全身性、静脉内、皮下、肌肉或经皮施用。

36. 如权利要求31所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体包含源自人IgG2恒定区的重链恒定区。

37. 如权利要求31所述的用途,其中所述药物还包含可药用的运载体、赋形剂和/或稳定剂。

38. 如权利要求31所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体是人源化的单克隆抗体。

39. 如权利要求31所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体被配制为用于以3 μ g/kg到100mg/kg的用量施用。

40. 如权利要求31所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体降低CGRP受体的CGRP生物活性。

41. 如权利要求31所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体是人单克隆抗体。

42. 如权利要求31所述的用途,其中所述头痛是有先兆或无先兆的偏头痛。

43. 如权利要求31所述的用途,其中所述头痛是偏瘫性偏头痛。

44. 如权利要求31所述的用途,其中所述头痛是丛集性头痛。

45. 如权利要求31所述的用途,其中所述头痛是偏头痛神经痛。

46. 如权利要求31所述的用途,其中所述头痛是久头痛。

47. 如权利要求31所述的用途,其中所述头痛是紧张性头痛。

48. 如权利要求31所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体阻断CGRP与其受体结合。

49. 如权利要求31所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体阻断对CGRP的细胞应答的激发。

50. 如权利要求31所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体阻断CGRP受体激活。

51. 如权利要求31所述的用途,其中所述抗CGRP拮抗剂抗体为IgG、IgM、IgE、IgA、IgD分子,或从其衍生而来。

针对降钙素基因相关肽的拮抗剂抗体及其使用方法

[0001] 本申请是中国发明专利申请200680042443.0 (PCT/IB2006/003181) 的分案申请, 母案申请日为2006年11月2日, 题目为“针对降钙素基因相关肽的拮抗剂抗体及其使用方法”。本申请要求于2005年11月14日提交的美国专利申请No.60/736,623的优先权, 其通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及抗CGRP拮抗剂抗体用于预防、改善或治疗血管运动症状如CGRP相关头痛(例如偏头痛)和热潮红的用途。

背景技术

[0003] CGRP(降钙素基因相关肽)是37个氨基酸的神经肽, 其属于肽家族, 包括降钙素、肾上腺髓质素和淀粉不溶素。在人中, 存在两种形式的CGRP(α -CGRP和 β -CGRP), 它们具有类似的活性。它们有三个氨基酸不同, 并显示不同的分布。至少两种CGRP受体亚型也可解释有差异的活性。CGRP是中枢神经系统中的神经递质, 并已显示是外周中有效的血管扩张药, 含CGRP的神经元在外周与血管紧密结合。CGRP介导的血管扩张也与神经原性炎症相关(其作为导致原生质外渗和微脉管系统血管舒张的事件级联的一部分), 其存在于偏头痛中。

[0004] CGRP因其与血管运动症状的可能联系而被注意(Wyon et al.Scand.J.Urol.Nephrol.35:92-96(2001);Wyon et al.Menopause 7(1):25-30(2000))。血管运动症状(VMS)如热潮红和寝汗是与绝经相关的最常见症状, 发生在所有在天然或手术诱导后绝经女性的60%到80%中。热潮红很可能是中枢神经系统(CNS)对减退的性类固醇的适应性应答(Freedman Am.J.Human Biol.13:453-464(2001))。迄今为止, 对于潮红的最有效的疗法是基于激素的治疗, 所述激素包括雌激素和/或一些黄体酮。激素治疗能够有效缓和潮红, 但是不适合所有女性。观察到的心理和情绪症状(如神经质、疲劳、易激惹、失眠、抑郁、失忆、头痛、焦虑、神经质或不能集中)被认为是由热潮红和寝汗后的睡眠缺乏引起的(Kramer et al., In:Murphy et al., 3.sup.rd Int'l Symposium on Recent Advances in Urological Cancer Diagnosis and Treatment-Proceedings, Paris, France:SCI:3-7(1992))。

[0005] 男性类固醇激素(雄激素)减少后也经历热潮红。在年龄相关的雄激素减退的情况下(Katovich, et al., Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine, 1990, 193(2):129-35)以及与前列腺癌治疗相关的激素丧失的极端情况下(Berendsen, et al., European Journal of Pharmacology, 2001, 419(1):47-54)是这样的。三分之一的这类患者会经历足够严重到引起显著不适和不便的长期和频繁的症状。

[0006] CGRP是与其它血管运动症状的病理学相关的有效的血管扩张剂, 所述症状例如所有形式的血管性头痛, 包括偏头痛(有先兆或无先兆)和丛集性头痛。Durham, N.Engl.J.Med.350:1073-1075, 2004。患者偏头痛期间颈外静脉中的CGRP水平升高。Goadsby et al., Ann.Neurol.28:183-7, 1990。静脉施用人 α -CGRP在患有无先兆偏头痛的

患者中诱导头痛和偏头痛,这提示CGRP在偏头痛中具有原因作用。Lassen et al., *Cephalalgia* 22:54-61,2002.

[0007] CGRP与偏头痛的可能相关性是开发和测试大量下述化合物的基础,所述化合物抑制CGRP的释放(例如叔马曲坦)、拮抗CGRP受体(例如二肽衍生物BIBN4096BS (Boehringer Ingelheim);CGRP (8-37))或与一种或多种受体相关蛋白质相互作用,所述受体相关蛋白质例如受体活性膜蛋白(RAMP)或受体组件蛋白质(RCP)均影响CGRP对其受体的结合。Brain, S. et al., *Trends in Pharmacological Sciences* 23:51-53,2002。A-2肾上腺素受体亚型和腺苷A1受体也调控(抑制)CGRP释放和三叉神经活化(Goadsby et al., *Brain* 125:1392-401,2002)。针对GR79236 (metrafadi1)腺苷A1的受体(其已经显示在人中抑制神经源性血管舒张和三叉神经伤害感受)也可以具有抗偏头痛的活性(Arulmani et al., *Cephalalgia* 25:1082-1090,2005;Giffin et al., *Cephalalgia* 23:287-292,2003)。

[0008] 使得该理论混淆的是下述观察:用仅抑制神经源性炎症(例如速激肽NK1受体拮抗剂)或三叉神经活化(例如5HT_{1D}受体激动剂)的化合物治疗显示作为偏头痛的急性治疗相对无效,引起一些研究人员质疑是否抑制CGRP释放是有效的抗偏头痛治疗的主要作用机制。Arulmani et al., *Eur. J. Pharmacol.* 500:315-330,2004。

[0009] 偏头痛是复杂的、常见的神经源性病症,其特征在于严重的、偶发的头痛和相关的特征,所述相关特征可包括恶心,呕吐,对光、声音或运动敏感。在一些患者中,头痛之前有前兆或伴随前兆。头痛可以是严重的,并在某些患者中也可以是单侧的。

[0010] 偏头痛发作对日常生活是破坏性的。在美国和西欧,偏头痛患者的总体患病率在一般人群中占11%(6%男性;15-18%女性)。另外,个体中发作的中位频率是1.5次/月。尽管能够获得大量治疗来缓和或减少症状,但是对每个月具有多于3-4次偏头痛发作的患者来说预防疗法是推荐的。Goadsby et al. *New Engl. J. Med.* 346 (4):257-275,2002。

[0011] 用于治疗偏头痛的药理学干涉的变化和患者间应答的多样性是该病症不同特性的证明。因此,显示5-羟色胺能以及肾上腺素能、去甲肾上腺素能、和多巴胺能活性的这类相对非选择性的药物,如麦角生物碱(例如麦角胺、二氢麦角胺、美西麦角),已经用于治疗偏头痛超过八十年。其它治疗包括阿片制剂(例如羟考酮)和β-肾上腺素能拮抗剂(例如普萘洛尔)。一些患者(通常是具有更温和症状的患者)能够用非处方药物控制它们的症状,所述非处方药例如一种或多种非甾体抗炎剂(NSAIDs),如阿司匹林、扑热息痛和咖啡因(例如**Excedrin®Migraine**)的组合。

[0012] 更近期地,已经用托吡酯治疗一些偏头痛患者,托吡酯是封闭电压依赖性钠通道和某些谷氨酸受体(AMPA红藻氨酸盐)、增强GABA-A受体活性和封闭碳酸酐酶的抗惊厥剂。相对而言更近期地,5-羟色胺5HT-1B/1D和/或5HT-1a受体激动剂(如叔马曲坦)在一些患者中的成功已经引起研究人员提出了该病症的5-羟色胺能病因学。不幸的是,尽管一些患者对该治疗反映良好,但是其它的患者对其作用相对有抵抗力。

[0013] 假定氨基酸能脑干细胞核中的离子通道功能障碍解释了该疾病,然而偏头痛的精确病理生理学仍未被充分理解。一种形式的偏头痛(家族性偏瘫偏头痛)已经显示与电压门控P/Q-型钙通道的α1亚基中的错义突变相关,人们认为很可能也在其它患者群体中发现其它的离子通道突变。尽管血管扩张与偏头痛相关并加重疼痛症状,但是这类神经血管事件目前被认为是该病症的结果而不是起因。总之,调节感觉输入的脑干途径的功能障碍被认

为是偏头痛的统一特征。Goadsby, P. J. et al., New Engl. J. Med. 346 (4): 257-275, 2002。

[0014] 在本申请中引用了多种出版物(包括专利和专利申请)。这些出版物的公开内容通过引用整体并入本文。

发明内容

[0015] 本文公开的发明涉及抗CGRP拮抗剂抗体和施用抗CGRP拮抗剂抗体用于治疗或预防血管运动症状的方法,所述血管运动症状例如头痛,如有先兆或无先兆的偏头痛、偏瘫性偏头痛、丛集性头痛、偏头痛神经痛、久头痛、紧张性头痛和由其它医疗条件(如由肿瘤引起的感染或颅内压升高)引起的头痛。其它血管运动症状包括热潮红。

[0016] 一方面,本发明提供了用于在个体中治疗或预防至少一种血管运动症状的方法,所述方法包括对个体施用有效量的抗CGRP拮抗剂抗体。

[0017] 一方面,本发明提供了用于在个体中治疗或预防头痛(例如偏头痛和丛集性头痛)的方法,所述方法包括对个体施用有效量的抗CGRP拮抗剂抗体。

[0018] 另一方面,本发明提供了用于在个体中改善、控制、减少头痛(例如偏头痛和丛集性头痛)发作或延迟头痛发生或发展的方法,所述方法包括对个体施用有效量的抗CGRP拮抗剂抗体。

[0019] 在另一实施方案中,本发明提供了用于在个体中改善、控制、减少头痛(例如偏头痛和丛集性头痛)发作或延迟头痛发生或发展的方法,所述方法包括对个体施用有效量的抗CGRP拮抗剂抗体与至少一种适用于治疗头痛的其它试剂的组合。这类其它试剂包括5-HT₁-样激动剂(作用于其它5-HT₁位点上的激动剂)和非甾体类抗炎药(NSAIDs)。

[0020] 可与抗CGRP抗体组合使用的5-HT₁激动剂的例子包括已知为曲坦类(triptans)的一类化合物,如叔马曲坦、佐米曲坦、那拉曲坦、利扎曲坦、伊立曲坦、阿莫曲坦和夫罗曲坦。麦角生物碱和相关化合物也显示具有5-HT激动剂活性并被用于治疗头痛如偏头痛。这些化合物包括麦角胺、马来酸麦角新碱和甲磺酰麦角碱(例如二氢麦角柯宁碱、双氢麦角汀、双氢麦角隐亭和双氢麦角胺甲磺酸盐(DHE 45))。

[0021] 可以与抗CGRP抗体组合使用的NSAIDs的例子包括萘普生、氟比洛芬、酮洛芬、奥沙普秦、依托度酸、吲哚美辛、酮咯酸、萘丁美酮、迈菲那密酸(mefanamic acid)和吡罗昔康。其它的NSAIDs包括环氧化酶2(COX-2)抑制剂。该组成员包括:塞来考昔;罗非考昔;美洛昔康;JTE-522;L-745,337;NS398及其可药用盐。

[0022] 另一方面,本发明提供了用于在个体中改善、控制、减少热潮红的发作或延迟其发生或发展的方法,所述方法包括对个体施用有效量的抗CGRP拮抗剂抗体。

[0023] 另一方面,本发明提供了用于在个体中改善、控制、减少热潮红的发作或延迟其发生或发展的方法,所述包括对个体施用有效量的抗CGRP拮抗剂抗体与至少一种适用于治疗热潮红的试剂的组合。这类其它试剂包括,但不限于基于激素(包括雌激素和/或黄体酮)的治疗。

[0024] 在一个实施方案中,在上述任何方法中使用的抗CGRP拮抗剂抗体是本文所述的任何抗体。

[0025] 在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体能识别人CGRP。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体与人 α -CGRP和 β -CGRP均能结合。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体能与人

和大鼠CGRP结合。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体结合具有CGRP的氨基酸25-37的C末端片段。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体结合CGRP的氨基酸25-37中的C末端表位。

[0026] 在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗体是人的。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体是抗体G1(如本文所述)。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体包含表6所示抗体G1或G1变体的一个或多个CDR(例如一个、两个、三个、四个、五个或在一些实施方案中包含所有六个CDR)。还在其它实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体包含图5所示重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)和图5所示轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0027] 在一些实施方案中,抗体包含下述经修饰的恒定区,所述恒定区例如是免疫惰性的(包括是部分免疫惰性的,其例如不引发补体介导的裂解、不刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、活化小胶质细胞),或具有降低的一种或多种这些活性。在一些实施方案中,恒定区被修饰,这如Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; PCT申请No. PCT/GB99/01441; 和/或UK专利申请No. 9809951.8中所述。在其它一些实施方案中,抗体包含人重链IgG2恒定区,所述恒定区包含以下突变:A330P331到S330S331(参考野生型IgG2序列的氨基酸排序)Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624。在一些实施方案中,抗体的重链恒定区是具任何以下突变的人重链IgG1: 1) A327A330P331到G327S330S331; 2) E233L234L235G236到P233V234A235, G236被删除; 3) E233L234L235到P233V234A235; 4) E233L234L235G236A327A330P331到P233V234A235G327S330S331, G236被删除; 5) E233L234L235A327A330P331到P233V234A235G327S330S331和6) N297到A297或除N以外的任何其它氨基酸。在一些实施方案中,抗体的重链恒定区为带有任何以下突变的人重链IgG4: E233F234L235G236到P233V234A235, G236被删除; E233F234L235到P233V234A235; 和S228L235到P228E235。

[0028] 还在其它一些实施方案中,恒定区N连接的糖基化不被糖基化(aglycosylated)。在一些实施方案中,通过突变寡糖附着残基(如Asn297)和/或侧翼残基(其为恒定区中N-糖基化识别序列的一部分),针对N连接的糖基化而言恒定区不被糖基化。在一些实施方案中,针对N连接的糖基化而言恒定区不被糖基化。可通过酶或通过糖基化缺陷宿主细胞中表达使得针对N连接的糖基化而言恒定区不被糖基化。

[0029] 抗CGRP拮抗剂抗体对CGRP(例如在合适温度如25或37℃下通过表面等离子共振测量的人 α -CGRP)的亲合力(K_D)可以是约0.02到约200nM。在一些实施方案中,亲合力为下述任何:约200nM、约100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM、约60pM、约50pM、约20pM、约15pM、约10pM、约5pM或约2pM。在一些实施方案中,亲合力少于下述任何:约250nM、约200nM、约100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM或约50pM。

[0030] 抗CGRP拮抗剂抗体可以在头痛之前、期间和/或之后被施用。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体在头痛(例如偏头痛和丛集性头痛)发作之前被施用。抗CGRP拮抗剂抗体的施用可以通过本领域已知的任何手段:口服、静脉内、皮下、动脉内、肌肉内、脊髓内、椎管内、胸内、腹膜内、心室内、舌下、经皮和/或经过吸入。施用可以是全身的(例如静脉内)或局部的。

[0031] 在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体可以与另一试剂(如用于治疗头痛的另一试剂)结合施用。

[0032] 另一方面,本发明提供了抗CGRP拮抗剂抗体用于制造本文所述任何方法中使用(例如用于治疗或预防头痛)的药物的用途。

[0033] 另一方面,本发明提供了用于预防或治疗头痛(例如偏头痛和丛集性头痛)的药物组合物,其包含有效量的抗CGRP拮抗剂抗体,所述抗体与一种或多种可药用赋形剂组合。

[0034] 另一方面,本发明提供了用于本文所述任何方法中的试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒包含容器、包含本文所述抗CGRP拮抗剂抗体的组合物(其与可药用媒介组合)和在本文所述任何方法中使用该组合物的说明书。

[0035] 本发明还提供了抗CGRP拮抗剂抗体和来自表6所示的抗体G1或其变体的多肽。因此,一方面,本发明是由ATCC编号Nos.PTA-6866和PTA-6867的表达载体生产的抗体G1(可交换地称作"G1")。例如,在一个实施方案中是包含重链的抗体,所述重链由ATCC编号为No.PTA-6867的表达载体生产。在再一个实施方案中为包含轻链的抗体,所述抗体由ATCC编号为No.PTA-6866的表达载体生产。G1的重链和轻链可变区的氨基酸序列在图5中显示。抗体G1的互补性决定区(CDR)部分(包括Chothia和Kabat CDRs)也显示在图5中。应理解:涉及G1任何局部或整体区域包括由具有ATCC编号Nos.PTA-6866和PTA-6867的表达载体生产的序列和/或图5中所示的序列。本发明还提供了具有表6所示氨基酸序列的G1抗体变体。

[0036] 一方面,本发明是包含V_H结构域的抗体,所述V_H在氨基酸序列上与SEQ ID NO:1至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同。

[0037] 另一方面,本发明是包含V_L的抗体,所述V_L在氨基酸序列上与SEQ ID NO:2至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同。

[0038] 另一方面,本发明是包含表6所示抗体G1或其变体的片段或区域的抗体。在一个实施方案中,片段为抗体G1的轻链。在另一实施方案中,片段为抗体G1的重链。还在另一实施方案中,片段含有来自抗体G1轻链和/或重链的一个或多个可变区。还在另一实施方案中,片段含有来自图5所示轻链和/或重链的一个或多个可变区。还在另一实施方案中,片段含有来自抗体G1轻链和/或重链的一个或多个CDR。

[0039] 另一方面,本发明提供了多肽(其可以是或不是抗体),所述多肽含有SEQ ID NO:5中公开的V_H CDR3,或与SEQ ID NO:5因1、2、3、4或5个氨基酸取代而不同的序列。在特别的实施方案中,这类氨基酸取代是保守的氨基酸取代。

[0040] 另一方面,本发明提供了多肽(其可以是或不是抗体),所述多肽含有SEQ ID NO:8中公开的V_L CDR3,或与SEQ ID NO:8因1、2、3、4或5个氨基酸取代而不同的序列。在特别的实施方案中,这类氨基酸取代是保守的氨基酸取代。

[0041] 另一方面,本发明提供了多肽(其可以是或不是抗体),所述多肽包含以下任一种或多种:a)来自表6所示抗体G1或其变体的一个或多个(一个、两个、三个、四个、五个或六个)CDR;b)来自表6所示抗体G1重链的CDR H3的CDR;和/或c)来自抗体G1轻链的CDR L3的CDR。在一些实施方案中,CDR为图5所示的CDR。在一些实施方案中,来自表6所示抗体G1或其变体的一个或多个CDR与G1或其变体的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个CDR至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约

97%、至少约98%或至少约99%相同。

[0042] 在一些实施方案中,CDR为Kabat CDR。在其它实施方案中,CDR为Chothia CDR。在其它实施方案中,CDR为Kabat和Chothia CDR的组合(也称作“组合的CDR”或“扩展的CDR”)。换言之,对于含有多于一个CDR的任何给定的实施方案而言,CDR可以是Kabat、Chothia和/或组合的中任一。

[0043] 在一些实施方案中,多肽(例如抗体)包含氨基酸序列KASKXaaVXaaTYVS,其中位置5上的Xaa为R、W、G、L或N;且其中位置7的Xaa为T、A、D、G、R、S、W或V。在一些实施方案中,氨基酸序列KASKXaaVXaaTYVS是抗体轻链的CDR1。

[0044] 在一些实施方案中,多肽(例如抗体)包含氨基酸序列XaaXaaSNRYXaa,其中位置1上的Xaa为G或A;其中位置2的Xaa为A或H;且其中位置7的Xaa为L、T、I或S。在一些实施方案中,氨基酸序列XaaXaaSNRYXaa是抗体轻链的CDR2。

[0045] 在一些实施方案中,多肽(例如抗体)包含氨基酸序列EIRSXaaSDXaaXaaATXaaYAXaaAVKG,其中位置5的Xaa为E、R、K、Q或N;其中位置8的Xaa为A、G、N、E、H、S、L、R、C、F、Y、V、D或P;其中位置9的Xaa为S、G、T、Y、C、E、L、A、P、I、N、R、V、D或M;其中位置12的Xaa为H或F;其中位置15的Xaa为E或D。在一些实施方案中,氨基酸序列EIRSXaaSDXaaXaaATXaaYAXaaAVKG是抗体重链的CDR2。

[0046] 在一些实施方案中,多肽(例如抗体)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:1位置99的氨基酸残基为L或被A、N、S、T、V或R取代;且其中SEQ ID NO:1位置100的氨基酸残基为A或被L、R、S、V、Y、C、G、T、K或P取代。

[0047] 在一些实施方案中,本发明的抗体是人抗体。在其它实施方案中,本发明的抗体是人源化的抗体。在一些实施方案中,抗体是单克隆的。在一些实施方案中,抗体(或多肽)被分离。在一些实施方案中,抗体(或多肽)是基本纯的。抗体的重链恒定区可以来自任何类型的恒定区(例如IgG、IgM、IgD、IgA和IgE)和任何同种型(如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。

[0048] 在一些实施方案中,抗体包含本文所述的经修饰的恒定区。

[0049] 另一方面,本发明提供了一种多核苷酸(其可以是被分离的),所述多核苷酸包含编码表6所示抗体G1或其变体的片段或区域的多核苷酸。在一个实施方案中,片段为抗体G1的轻链。在其它实施方案中,片段为抗体G1的重链。还在另一实施方案中,片段含有来自抗体G1轻链和/或重链的一个或多个可变区。还在另一实施方案中,片段含有来自抗体G1轻链和/或重链的一个或多个(即一个、两个、三个、四个、五个或六个)互补性决定区(CDRs)。

[0050] 另一方面,本发明是一种多核苷酸(其可以是被分离的),所述多核苷酸含有编码表6所示抗体G1或其变体的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示的多核苷酸之一或二者。

[0051] 另一方面,本发明提供了编码本文所述任何抗体(包括抗体片段)或多肽的多核苷酸。

[0052] 另一方面,本发明提供了包含本文公开的任何多核苷酸的载体(包括表达载体和克隆载体)和宿主细胞。在一些实施方案中,载体为ATCC No.PTA-6867的pDb.CGRP.hFcGI。在其它实施方案中,载体为ATCC No.PTA-6866的pEb.CGRP.hKGI。

[0053] 另一方面,本发明是包含多核苷酸的宿主细胞,所述多核苷酸编码本文公开的任何抗体。

[0054] 另一方面,本发明是被本文所述任何抗体或多肽结合的CGRP复合物。在一些实施方案中,抗体是表6所示的抗体G1或其变体。

[0055] 另一方面,本发明是药物组合物,其包含有效量的本文所述任何多肽(包括抗体,如包含一个或多个抗体G1的CDR的抗体)或多核苷酸,和可药用的赋形剂。

[0056] 另一方面,本发明是产生抗体G1的方法,包括在允许生产抗体G1的条件下培养宿主细胞或其后代,其中所述宿主细胞包含编码抗体G1的表达载体;和在一些实施方案中纯化抗体G1。在一些实施方案中,表达载体包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示多核苷酸序列之一或二者。

[0057] 另一方面,本发明提供了通过在合适的细胞中表达一种或多种多核苷酸来生产本文所述任何抗体或多肽(通常随后回收和/或分离感兴趣的抗体或多肽)的方法,所述多核苷酸编码抗体(其可以被单独地表达为单个轻链或重链,或从一个载体表达轻链和重链二者)或多肽。

[0058] 抗CGRP拮抗剂抗体和多肽和编码本发明抗体和多肽的多核苷酸可以用于治疗、预防、改善、控制或减少CGRP异常功能相关疾病如头痛(例如偏头痛、丛集性头痛、久头痛和紧张性头痛)和其它病症(其可通过拮抗CGRP活性被治疗或预防)的发作。

[0059] 另一方面,本发明提供了包含本文所述任一种或多种组合物的试剂盒和组合物。这些试剂盒(其通常被适当地包装并与合适的说明书一起提供)适用于本文所述的任何方法。

[0060] 附图概述

[0061] 图1是显示12种鼠抗体对不同丙氨酸取代的人 α -CGRP片段的亲合力的表格。在25 $^{\circ}$ C,下使用Biacore,通过将Fab流过芯片上的CGRP测量亲合力。框内数值代表丙氨酸突变体相对于亲本片段25-37(斜体)的亲合力丧失,来自19-37亲本的K35A除外。“a”表示19-37和25-37片段的亲和力是在不同感受芯片上两个独立测量的平均值 $\pm$ 标准偏差。“b”表示由于二相解离速率(offrate),这些相互作用与单一双分子相互作用模型有所偏差,从而使用构象改变模型测定它们的亲和力。灰标度键:白色(1.0)指示亲本亲和力;浅灰(小于0.5)指示比亲本更高的亲和力;深灰(多于2)指示比亲本更低的亲和力;黑色指示未检测到结合。

[0062] 图2A和2B显示了施用CGRP 8-37(400nmol/kg)、抗体4901(25mg/kg)和抗体7D11(25mg/kg)对皮肤血流量的作用,这作为电脉冲刺激30秒后的血细胞通量来测量。在电脉冲刺激之前3-5分钟,静脉内(iv)施用CGRP 8-37。电脉冲刺激前72小时,腹膜内(IP)施用抗体。图中每个点表示指定条件下处理的一只大鼠的AUC。图中每条线表示在指定条件下处理的大鼠的平均AUC。AUC(曲线下面积)等于 Δ 通量 $\times$ Δ 时间。“ Δ 通量”表示电脉冲刺激后通量单位的变化;“ Δ 时间”表示血细胞通量水平恢复为电脉冲刺激之前水平所需时间。

[0063] 图3显示了施用不同剂量的抗体4901(25mg/kg,5mg/kg,2.5mg/kg或1mg/kg)对皮肤血流量的作用,这作为电脉冲刺激30秒后的血细胞通量来测量。电脉冲刺激之前24小时静脉内(IV)施用抗体。图中每点表示在指定条件下处理的一只大鼠的AUC。图中线条表示在指定条件下处理的大鼠的平均AUC。

[0064] 图4A和4B显示了施用抗体4901(1mg/kg or 10mg/kg, Lv.)、抗体7E9(10mg/kg, i.v.)和抗体8B6(10mg/kg, i.v.)对皮肤血流的作用,这作为电脉冲刺激30秒后的血细胞通量来测量。抗体被静脉内(i.v.)施用,然后在抗体施用后30分钟、60分钟、90分钟和120分钟

进行电脉冲刺激。Y轴表示与未施用抗体时(时间0)的AUC水平相比的AUC百分比。X轴表示施用抗体和电脉冲刺激之间的时间(分钟)。与时间0相比,"*"表示 $P < 0.05$,"**"表示 $P < 0.01$ 。使用单向ANOVA用Dunnett's多重比较检验分析数据。

[0065] 图5显示了抗体G1的重链可变区(SEQ ID NO:1)和轻链可变区(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列。Kabat CDR为黑体,Chothia CDR加下划线。重链和轻链可变区的氨基酸残基被连续编号。

[0066] 图6显示了使用Biacore通过肽竞争对抗体G1的表位作图。N生物素化的人 α -CGRP被捕获在SA感受芯片上。没有竞争肽时或与10 μ M竞争肽孵育1小时后,将G1 Fab (50nM)倒在芯片上。测量芯片上G1 Fab对人 α -CGRP的结合。Y轴表示与不存在竞争肽时相比,竞争肽的存在封闭的结合百分比。

[0067] 图7显示了使用抗体G1 (1mg/kg或10mg/kg,静脉内)或运载体(PBS,0.01% Tween 20)对皮肤血流的作用,这作为电脉冲刺激30秒后的血细胞通量来测量。抗体G1或运载体被静脉内(i.v.)施用,然后在抗体施用后30分钟、60分钟、90分钟和120分钟进行神经电脉冲刺激。Y轴表示与未施用抗体或运载体时(时间0)的AUC水平(定义为100%)相比的AUC百分比。X轴表示施用抗体和电脉冲刺激之间的时间(分钟)。与运载体相比,"*"表示 $P < 0.05$,"**"表示 $P < 0.01$ 。施用双向ANOVA和Bonferroni后期检验分析数据。

[0068] 图8A显示了施用抗体G1 (1mg/kg,3mg/kg或10mg/kg,静脉内)或运载体(PBS,0.01% Tween 20)对皮肤血流的作用,这作为给药后24小时电脉冲刺激30秒后的血细胞通量来测量。抗体G1或运载体在神经电脉冲刺激前24小时被静脉内(i.v.)施用。Y轴表示曲线下的总面积(血细胞通量变化乘以刺激到通量恢复基线的时间差,AUC)。X轴表示抗体G1的不同剂量。与运载体相比,"*"表示 $P < 0.05$,"**"表示 $P < 0.01$ 。施用单向ANOVA和Dunn's多重比较检验分析数据。

[0069] 图8B显示了施用抗体G1 (0.3mg/kg,1mg/kg,3mg/kg或10mg/kg,静脉内)或运载体(PBS,0.01% Tween 20)对皮肤血流的作用,这作为给药后7天电脉冲刺激30秒后的血细胞通量来测量。抗体G1或运载体在神经电脉冲刺激前7天被静脉内(i.v.)施用。Y轴表示总AUC。X轴表示抗体G1的不同剂量。与运载体相比,"**"表示 $P < 0.01$,"***"表示 $P < 0.001$ 。施用单向ANOVA和Dunn's多重比较检验分析数据。

[0070] 图8C是对来自图8A和8B的数据的曲线拟合分析。抗体G1或运载体在神经电脉冲刺激前24小时或7天静脉(i.v.)施用。Y轴表示总AUC。X轴表示不同的G1剂量,以"mg/kg"为单位,用对数标度以测定EC₅₀。

[0071] 图9显示了电场刺激后抗体mu7E9 (10mg/kg)、BIBN4096BS或运载体(PBS,0.01% Tween 20)对脑膜中动脉直径改变的作用。在建立对电刺激的基线应答后0分钟的时间点静脉(i.v.)施用抗体mu7E9、BIBN4096BS或运载体。Y轴表示电场刺激后脑膜中动脉直径的改变。静止直径对应0%。X轴表示电脉冲刺激的时间(分钟)。与运载体相比,"*"指示 $P < 0.05$,"**"指示 $P < 0.01$ 。使用单向ANOVA和Dunnett's多重比较检验分析数据。

[0072] 图10显示了电场刺激后不同剂量的抗体G1 (1mg/kg,3mg/kg或10mg/kg,静脉)或运载体(PBS,0.01% Tween 20)对脑膜中动脉直径改变的作用。在电场刺激前7天静脉(i.v.)施用抗体G1或运载体。Y轴表示脑膜中动脉直径的改变。静止直径对应0%。X轴表示刺激电压。与运载体相比,"*"指示 $P < 0.05$,"**"指示 $P < 0.01$,"***"指示 $P < 0.001$ 。使用双向

ANOVA和Bonferroni posttests分析数据。

[0073] 图11A显示了在吗啡上瘾的大鼠中皮下注射纳洛酮(1mg/kg)之前24小时静脉(i.v.)施用抗体mu4901(10mg/kg)或运载体(PBS,0.01%Tween 20)对所述皮下注射诱导的体核温度降低的作用。Y轴表示与基线的温度差异。X轴表示从注射纳洛酮的点开始测量的时间。

[0074] 图11B显示了在吗啡上瘾的大鼠中皮下注射纳洛酮(1mg/kg)之前24小时静脉(i.v.)施用抗体mu4901(10mg/kg)或运载体(PBS,0.01%Tween 20)对所述皮下注射诱导的尾表温度提高的作用。Y轴表示与基线的温度差异。X轴表示从注射纳洛酮的点开始测量的时间。

[0075] 发明详述

[0076] 本文公开的本发明提供了通过对个体施用治疗有效量的抗CGRP拮抗剂抗体,用于在个体中治疗和/或预防血管运动症状如头痛(例如偏头痛、丛集性头痛、久头痛和紧张性头痛)或热潮红的方法。

[0077] 本文公开的本发明还提供了来自表6所示G1或其变体的抗CGRP拮抗剂抗体和多肽。本发明还提供了这些抗体和多肽的制造和使用方法。

[0078] 一般技术

[0079] 除非另有说明,本发明的实践将使用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,其在本领域技术的范围内。这类技术已在文献中被充分解释,所述文献例如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.Cellis,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,and 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 and J.D.Capra,eds.,Harwood Academic Publishers,1995)。

[0080] 定义

[0081] “抗体”是能够通过位于免疫球蛋白分子可变区的至少一个抗原识别位点特异结

合靶标(如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)的免疫球蛋白分子。本文使用的该术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,而且包括其片段(如Fab,Fab',F(ab')₂,Fv)、单链(ScFv)、突变体、包含抗体部分的融合蛋白(如结构域抗体)和免疫球蛋白分子的包含抗原识别位点的任何其它经修饰的构型。抗体包括任何种类的抗体,如IgG、IgA或IgM(或其亚家族),且抗体不必须是任何特别的种类。可以根据抗体重链恒定结构域的氨基酸序列,将免疫球蛋白指定为不同的种类。存在五种主要的免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中一些可以被进一步分为亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同免疫球蛋白家族的重链恒定结构域分别被称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同家族免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是公知的。

[0082] 本文使用的“单克隆抗体”是指从一群基本均质的抗体获得的抗体,即除了可少量存在的可能的天然存在的突变外,包含该种群的个体抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异的,其针对单个抗原性位点。另外,与多克隆抗体制剂(其典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体)相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆的”指示抗体的特性是得自基本均质的抗体种群,并不应被理解为要求通过任何特定的方法生产抗体。例如,可以通过首先由Kohler and Milstein,1975,Nature,256:495描述的杂交瘤方法来制造,或可以通过U.S.Pat.No.4,816,567中所述的重组DNA方法来制造根据本发明待使用的单克隆抗体。单克隆抗体也可以分离自噬菌体文库,所述噬菌体文库使用例如McCafferty et al.,1990,Nature,348:552-554中所述的技术产生。

[0083] 本文使用的“人源化的”抗体是指非人(例如鼠)抗体的下述形式,其为特异的嵌合体免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其含有来自非人免疫球蛋白的最小序列的片段(例如Fv,Fab,Fab',F(ab')₂或抗体的其它抗原结合亚序列)。对于大部分而言,人源化的抗体是下述人免疫球蛋白(受体抗体),所述人免疫球蛋白中来自受体的互补性决定区(CDR)被替换为来自非人物种的CDR(供体抗体)的残基,所述非人物种如小鼠、大鼠或兔,所述来自非人物种的CDR具有所需的特异性、亲和力和生物活性。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被替换为相应的非人残基。另外,人源化抗体可包含下述残基,所述残基既不存在于受体抗体中,也不存在于引入的CDR或框架区中,但是被包括在内以进一步精制和优化抗体表现。通常,人源化抗体基本包含所有的(至少一个,典型地两个)可变结构域,其中所有或几乎所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区,所有或几乎所有的FR区是人免疫球蛋白共有序列的FR区。人源化抗体最适当地也包含至少一部分免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc),典型地为人免疫球蛋白的恒定区或结构域。抗体可具有如WO 99/58572中所述被修饰的Fc区。其它形式的人源化抗体具有一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个、六个),其根据原始抗体被改变,也称作“来自”一个或多个原始抗体CDR的一个或多个CDR。

[0084] 本文使用的“人抗体”是指具有对应于下述抗体氨基酸序列的抗体,所述抗体由人生产和/或使用本领域已知或本文公开的用于制造人抗体的任何技术制造。人抗体的该定义包括包含至少一个人重链多肽或至少一个人轻链多肽的抗体。一个这样的例子是包含鼠轻链和人重链多肽的抗体。人抗体可以使用本领域已知的多种技术生产。在一个实施方案中,人抗体选自噬菌体文库,其中该噬菌体文库表达人抗体(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)。也

可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物(例如小鼠,其中内源免疫球蛋白基因已经被部分或完全灭活)中制造人抗体。该途径描述于U.S.专利Nos.5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425和5,661,016。或者,可以通过使生产针对靶抗原的抗体的人B淋巴细胞(这类B淋巴细胞可从个体回收或可以在体外被免疫)永生来制备人抗体。参见例如Cole et al.,*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p.77 (1985); Boemer et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95和U.S.专利No.5,750,373。

[0085] 本文使用的术语“降钙素基因相关肽”和“CGRP”是指维持至少部分CGRP活性的任何形式的降钙素基因相关肽及其变体。例如,CGRP可以是 α -CGRP或 β -CGRP。本文使用CGRP包括所有哺乳动物种类的天然序列CGRP,例如人、犬、猫、马和牛。

[0086] 本文使用的“抗CGRP拮抗剂抗体”(可与“抗CGRP抗体”互换使用)是指下述抗体,所述抗体能够结合CGRP并抑制CGRP生物活性和/或CGRP信号转导介导的下游途径。抗CGRP拮抗剂抗体包括下述抗体,所述抗体能够(包括显著地)封闭、拮抗、抑制或降低CGRP生物活性,包括由CGRP信号转导的下游途径如受体结合和/或对CGRP细胞应答的激发。就本发明的目的而言,应明确地理解:术语“抗CGRP拮抗剂抗体”包括所有先前定义的术语、题目和功能状态和特征,由此,CGRP自身、CGRP生物活性(包括但不限于其介导任何方面头痛的能力)或生物活性的后果以任何有意义的程度上被实质上无效、降低或中和。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体结合CGRP并防止CGRP结合CGRP受体。在其它实施方案中,抗CGRP抗体结合CGRP并防止CGRP受体的激活。本文提供了抗CGRP拮抗剂抗体的例子。

[0087] 本文使用的术语“G1”和“抗体G1”可互换地使用,它们指由具有保藏号ATCC PTA-6867和ATCC PTA-6866的表达载体生产的抗体。图5显示了重链和轻链可变区的氨基酸序列。抗体G1的CDR部分(包括Chothia和Kabat CDRs)图示于图5中。编码重链和轻链可变区的多核苷酸显示于SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中。G1的表征描述于实施例中。

[0088] 术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”在本文可互换使用,来表示任何长度的氨基酸多聚体。该多聚体可以是线性的或分支的,其可含有经修饰的氨基酸,其可以被非氨基酸阻断。所述术语还包括已经被天然修饰或通过干涉被修饰的氨基酸多聚体;例如二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其它加工或修饰,如与标签组分的缀合。还包括在定义中的是例如含有有一个或多个氨基酸类似物(包括例如非天然的氨基酸等)以及本领域已知的其它修饰的多肽。理解到因为本发明的多肽是以抗体为基础的,所以所述多肽能够作为单链或结合的链存在。

[0089] 本文可互换地使用的“多核苷酸”或“核酸”指任何长度的核苷酸多聚体,并包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基,和/或它们的类似物,或可以由DNA或RNA聚合酶掺入多聚体中的任何底物。多核苷酸可包含经修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和它们的类似物。如果存在对核苷酸结构的修饰,该修饰可以在多聚体装配之前或之后给予。核苷酸的序列可以被非核苷酸组件阻断。多核苷酸可在多聚化后被进一步修饰,例如通过与标签组件缀合来修饰。其它类型的修饰包括例如“帽子”、用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰,以及未修饰形式的多核苷酸,所述核苷酸间修饰例如为用不带电的键(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酸酰胺、氨基甲酸酯等)修饰和用带电的键(硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)修饰、含有悬挂部分如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、ply-L-赖氨酸等)的修饰、用插入剂(例如吡啶、补骨脂素等)修

饰、含有螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化金属等)的修饰、含有alkylator的修饰、用经修饰的键(例如 α 异头核酸)修饰。另外,任何通常存在于糖中的羟基基团可以被磷酸酯基团、磷酸基替换,被标准的保护基团保护,或被激活来制备与额外的核苷酸的额外键,或可以与固体支持物缀合。5' 和3' 端的OH可以被磷酸化或被胺或1到20个碳原子的有机加帽基团部分取代。其它羟基也可以被演化为标准的保护基团。多核苷酸还可以含有本领域一般已知的类似形式的核糖或脱氧核糖,包括例如2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基、2'-氟-或2'-叠氮基-核糖,碳环糖类似物,D-异头糖,差向异构体糖如阿拉伯糖、木糖或来苏糖,吡喃糖,呋喃糖,景天庚酮糖,非环状类似物和非碱性核苷类似物如甲基核糖核苷。一个或多个磷酸二酯键可以被替换为备选的连接基团。这些备选的连接基团包括,但不限于其中磷酸盐被替换为P(O)S("硫代酸盐")、P(S)S("二硫代酸盐")、(O)NR₂("酰胺化物")、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂("formacetal")的实施方案,其中每个R或R'独立地为H或被任选地含有(-O-)键、芳基、链烯基、环烷基、环链烯基或araldyl的烷基(1-20C)取代或未取代。多核苷酸中所有的键不必是相同的。前文的叙述适用于本文所指的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0090] 抗体的“可变区”是指抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区,其为单独的或组合的。重链和轻链的可变区各由四个框架区(FR)组成,所述四个框架区被三个互补性决定区(CDR)连接,所述互补性决定区也称作超变区。每个链中的CDR通过FR被紧密结合在一起,并与来自另一条链的CDR一起有助于形成抗体的抗原结合位点。存在至少两种用于确定CDR的技术:(1)以跨物种序列变异性为基础的途径(即Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD));和(2)以抗原-抗体复合物的晶体学研究为基础的途径(Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)。本文使用的CDR可表示由任一途径或两个途径的组合定义的CDR。

[0091] 抗体的“恒定区”指抗体轻链的恒定区或抗体重链的恒定区,其为单独的或组合的。

[0092] 与抗体或多肽“优先结合”或“特异结合”(在本文可互换使用)的表位是本领域公知的术语,确定这类特异或优先结合的方法也是本领域公知的。如果一个分子与特定细胞或物质反应或结合比起它与其它细胞或物质的反应或结合而言更频繁、更快速、有更长持续时间和/或有更大亲和力,则称该分子显示“特异结合”或“优先结合”。如果抗体与靶标结合比起它与其它物质的结合具有更大亲和力、亲合力、更容易和/或具有更长持续时间,则该抗体“特异结合”或“优先结合”该靶标。例如,与CGRP特异或优先结合的抗体是下述抗体,所述抗体与该表位的结合比起它与其它CGRP表位或非CGRP表位的结合具有更大的亲和力、亲合力、更容易和/或具有更长的持续时间。通过阅读该定义还应理解到例如,与第一靶标特异或优先结合的抗体(或部分或表位)可与第二靶标特异或优先结合,或不特异或优先结合。同样,“特异结合”或“优先结合”不必须要求(尽管其可包括)专一结合。通常但不必须地,涉及结合时表示优先结合。

[0093] 本文使用的“基本纯”是指至少50%纯(即不含污染物)、更优选至少90%纯、更优选至少95%纯、更优选至少98%纯、更优选至少99%纯的材料。

[0094] “宿主细胞”包括可以是或已经是载体受体的个体细胞或细胞培养物,所述载体用于掺入多核苷酸插入物。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,并且因为天然、偶然或故意的

突变,所述后代不必须与原始的亲本细胞(在形态学或基因组DNA补体上)完全相同。宿主细胞包括用本发明的多核苷酸体内转染的细胞。

[0095] 术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链C末端区域。“Fc区”可以是天然序列Fc区或变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区边界可变化,但是人IgG重链Fc区通常被定义为从位置Cys226的氨基酸残基或Pro230开始到其羧基端的一段。Fc区中残基的排序是如Kabat中的EU索引排序。Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991。免疫球蛋白的Fc区通常含有两个恒定结构域CH2和CH3。

[0096] 本文使用“Fc受体”和“FcR”描述了结合抗体Fc区的受体。优选的FcR为天然序列人FcR。另外,优选的FcR是结合IgG抗体(γ 受体)的FcR,并包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体或者间接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“激活受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),其具有主要在其胞浆区差异的类似的氨基酸序列。Ravetch and Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel et al., 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; 和de Haas et al., 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41中综述了FcR。“FcR”也包括新生儿受体FcRn,其负责母体IgG到胎儿的转移(Guyer et al., 1976, *J. Immunol.*, 117:587; and Kim et al., 1994, *J. Immunol.*, 24:249)。

[0097] “补体依赖性细胞毒性”和“CDC”是指存在补体时靶标的溶解。补体系统的第一个组件(C1q)和与同种抗原复合的分子(例如抗体)的结合启动补体激活途径。为了评价补体活化,可进行例如Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996)中所述的CDC实验。

[0098] “功能性Fc区”拥有天然序列Fc区的至少一个效应子作用。示范性的“效应子作用”包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞接到的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调等。这类效应子作用通常要求Fc区与结合结构域(例如抗体可变结构域)组合并可使用本领域已知用于评估这类抗体效应子作用的多种实验评价。

[0099] “天然序列Fc区”包含与天然存在的Fc区氨基酸序列相同的氨基酸序列。“变体Fc区”包含与天然序列Fc区通过至少一个氨基酸修饰而不同、但是维持天然序列Fc区至少一个效应子作用的氨基酸序列。优选地,与天然序列Fc区相比或与亲本多肽的Fc区相比,变体Fc区具有至少一个氨基酸取代,例如天然序列Fc区中或亲本多肽的Fc区中从约一个到约十个氨基酸取代,优选地从约一个到约五个氨基酸取代。本文的变体Fc区优选地与天然序列Fc区和/或与亲本多肽Fc区具有至少约80%的序列同一性,最优选与之有至少约90%的序列同一性,更优选与之有至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%的序列同一性。

[0100] 本文使用的“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcRs)的非特异性的细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体,随后引起靶细胞裂解。感兴趣的分子的ADCC活性可以使用体外ADCC实验评估,例如描述于U.S. 专利No. 5,500,362或5,821,337中的实验。适用于这些实验的效应子细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和NK细胞。或者或另外地,感兴趣的分子的ADCC活性可以体内评估,例如在如Clynes et al., 1998, *PNAS (USA)*, 95:652-656中公

开的动物模型中评估。

[0101] 本文使用的“治疗”是用于获得有益的或所期望的临床结果的途径。就本发明的目的而言,有益的或所期望的临床结果包括,但不限于以下一种或多种:在头痛的任何方面改进,包括减轻严重性、缓和疼痛强度和其它相关症状、减少复发频率、提高患有头痛患者的生活质量和减少治疗头痛所需其它药物的剂量。对于偏头痛而言,其它相关症状包括,但不限于恶心、呕吐和对光、声音和/或运动敏感。对于丛集性头痛而言,其它相关症状包括,但不限于眼下方或周围肿胀、多泪、红眼、鼻漏或鼻充血和潮红的脸。

[0102] “降低”头痛“发生率”表示任何降低的严重性(其可包括降低通常用于该病症的其它药物和/或治疗的需要和/或用量(例如暴露),所述其它药物包括例如用于偏头痛的麦角胺、双氢麦角胺或triptan)、持续时间和/或频率(包括例如在个体中延迟或提高到下次偶然发作的时间)。如本领域技术人员所理解的,个体可在它们对治疗的应答方面不同,同样,例如“减少个体中头痛发作的方法”表现了在合理期望(这类施用很可能在特定个体中导致这样的发病率降低)的基础上施用抗CGRP拮抗剂抗体。

[0103] “改善”头痛或头痛的一种或多种症状表示与未施用抗CGRP拮抗剂抗体相比,头痛的一种或多种症状的减少或改进。“改善”也包括缩短或减少症状的持续时间。

[0104] 本文使用的“控制头痛”是指在个体中维持或降低头痛的一种或多种症状的严重性或持续时间或头痛发作的频率(与治疗前的水平相比)。例如,与治疗前水平相比,个体中头痛持续时间或严重性或发作频率被降低至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%或70%之任一。

[0105] 本文使用的“延迟”头痛的发生是指延迟、妨碍、减缓、延缓、稳定和/或推迟疾病的进展。该延迟可以是不同长度的时间,取决于疾病史和、或被治疗的个体。如本领域技术人员所明白的,足够或显著的延迟可以有效地包括预防,因为个体不会发生头痛(例如偏头痛)。“延迟”症状发生的方法是与未使用该方法相比时,降低给定时间范围内发生症状的可能性和/或降低给定时间范围内症状程度的方法。这类比较典型地以临床研究为基础,使用统计学显著数量的受试者。

[0106] 头痛的“发生”或“发展”表示表示该病症的最初表现和/或随后的进展。头痛的发生是可检测的,并使用本领域公知的标准临床技术评价。然而,发生也表示不可检测的进展。就本发明的目的而言,发生或发展表示症状的生物学过程。“发生”包括发作、复发和发病。本文使用头痛的“发病”或“发作”包括初始发病和/或复发。

[0107] 本文使用的药物、化合物或药物组合物的“有效剂量”或“有效量”是足够产生有益的或期望的结果的量。对于预防性用途而言,有益的或期望的结果包括例如消除或降低风险、减轻严重性或延迟疾病开始的结果,包括疾病的生物化学、组织学和/或行为症状,其并发症和在疾病发生时存在的中间病理学表型。对于治疗学用途而言,有益或期望的结果包括下述结果,例如降低疼痛强度、持续时间、或头痛发作频率和减少头痛引起的一种或多种(生物化学、组织学和/或行为)症状(包括其并发症和在疾病发生时存在的中间病理学表型)、提高该疾病患者的生活质量、减少治疗该疾病所需其它药物疗法的剂量、增强另一药物疗法的作用和/或延迟患者疾病的发展。有效剂量可以在一次或多次施用中被施用。就本发明的目的而言,有效的药物、化合物或药物组合物剂量是足够直接或间接完成预防性或治疗性治疗的用量。如临床语境中所理解的,有效的药物、化合物或药物组合物剂量可以与

其它药物、化合物或药物组合物结合或不结合地达到。因此,在施用一种或多种治疗剂的语境中如果可以达到或达到了期望的结果,则可认为是“有效剂量”;单一剂量与一种或多种其它试剂组合时,如果可以达到或达到了期望的结果,则可认为是以有效的剂量提供的。

[0108] “个体”或“受试者”是哺乳动物,更优选为人。哺乳动物还包括但不限于:农业动物、运动动物、宠物、灵长类、马、犬、猫、小鼠和大鼠。

[0109] 本文使用的“载体”表示一种构建体,其能够将一个或多个感兴趣的基因或序列递送进宿主细胞并优选在其中表达。载体的例子包括,但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子冷凝剂结合的DNA或RNA表达载体、包裹在脂质体中的DNA或RNA表达载体,和某些真核生物细胞如生产者细胞。

[0110] 本文使用的“表达调控序列”是指指导核酸转录的核酸序列。表达调控序列可以是启动子(如组成型或诱导型启动子)或增强子。表达调控序列与待转录的核酸序列可操作地连接。

[0111] 本文使用的“可药用的运载体”或“可药用的赋形剂”包括任何下述材料,其与活性成分组合时允许该成分维持生物活性,并且对受试者的免疫体系是无反应性的。例子包括但不限于:任何标准的药物运载体,如磷酸盐缓冲的盐水溶液、水、乳剂(如油/水乳剂)和多种类型的湿润剂。用于气雾剂或肠胃外施用的优选稀释剂为磷酸盐缓冲的盐水或生理(0.9%)盐水。包含这类运载体的组合物通过公知的常规方法配制(参阅例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; 和Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000)。

[0112] 本文使用术语“ k_{on} ”旨在表示抗体与抗原的结合速率常数。

[0113] 本文使用术语“ k_{off} ”旨在表示抗体从抗体/抗原复合物解离的速率常数。

[0114] 本文使用术语“ K_D ”旨在表示抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0115] 本文使用术语“血管运动症状”旨在表示与血管舒张相关的病症,包括但不限于特别是由温度调节功能障碍导致的头痛(例如偏头痛、……其它)、热潮红、冷潮红(或瞬间热潮红(hot flashes))、失眠、睡眠紊乱、心境障碍、易激惹、大汗、寝汗、昼汗、疲劳等等。

[0116] 本文使用术语“面红”、“热潮红”和“瞬间热潮红”是本领域认可的术语,其表示体温偶发性紊乱,典型地由突发的皮肤潮红组成,通常伴随受试者的排汗。

[0117] A. 用于预防或治疗血管运动症状的方法

[0118] 一方面,本发明提供了用于在个体中治疗或预防至少一种血管运动症状如头痛(例如偏头痛)或热潮红的方法,所述方法包括对个体施用有效量的抗CGRP拮抗剂抗体或来自该抗体的多肽。

[0119] 另一方面,本发明提供了用于在个体中改善、控制、减少至少一种血管运动症状发作或延迟其发生或发展的方法,所述症状如头痛(例如偏头痛)或热潮红,所述方法包括对个体施用有效量的抗CGRP拮抗剂抗体。

[0120] 另一方面,本发明提供了用于在个体中改善、控制、减少头痛(例如偏头痛)发作或延迟其发生或发展的方法,包括对个体施用有效量的抗CGRP拮抗剂抗体与至少一种适用于治疗头痛的其它试剂的组合。

[0121] 这类其它试剂包括但不限于:5-HT激动剂和NSAID。例如,抗体和至少一种其它试

剂可以伴随施用,即它们可以以足够接近的时间接近度施用从而允许它们个体的治疗作用重叠。例如,与抗CGRP抗体组合施用的5-HT激动剂或NSAID的量应当足以降低患者中头痛复发的频率,或产生与施用这些试剂中的一种而不存在其它时相比更长的持久作用。该步骤可用于治疗落入多种种类之任一中的头痛,包括:有先兆或无先兆的偏头痛;丛集性头痛;偏头痛性神经痛;久头痛;紧张性头痛;其它医学病症(例如感染或肿瘤引起的颅内压升高)导致的头痛;慢性发作性偏头痛;与结构损伤无关的多种头痛;与非血管性颅内病症相关的头痛;与物质施用及其停药相关的头痛;与非头感染相关的头痛;与代谢紊乱相关的头痛;与颅、颈、眼、耳、鼻、窦房结、牙、口或其它面部或颅结构病症相关的头痛;脑神经痛和神经干痛和去传入(deafferentiation)痛。

[0122] 本领域技术人员能够确定与抗CGRP抗体组合使用的特定试剂的合适剂量。例如,可以从约0.01到约300mg的剂量施用舒马曲坦。当非肠胃外施用时,舒马曲坦的典型剂量为从约25到约100mg。通常优选约50mg,当肠胃外施用时,优选的剂量为约6mg。然而,这些剂量可以根据本领域的标准方法改变,从而将其针对特定患者或特定的组合治疗最优化。另外,例如塞来考昔可以以50和500mg之间的用量被施用。

[0123] 另一方面,本发明提供了用于在个体中改善、控制、减少热潮红发作或延迟其发生或发展的方法,包括对个体施用有效量的抗CGRP拮抗剂抗体与至少一种适用于治疗热潮红的其它试剂的组合。这类其它试剂包括,但不限于基于激素的治疗,所述激素包括雌激素和/或一些黄体酮。

[0124] 关于本文所述的所有方法,提及抗CGRP拮抗剂抗体时也包括包含一种或多种这些试剂的组合物。这些组合物可进一步包含本领域公知的合适赋形剂,如包括缓冲液的可药用赋形剂。本发明可单独使用或与其它常规治疗方法组合使用。

[0125] 抗CGRP拮抗剂抗体可以通过任何合适的途径施用给个体。本领域技术人员应当明白:本文所述的实施例不旨在限制,而是对可用技术的阐述。因此在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体根据已知的方法施用给个体,例如静脉施用(例如作为推注施用或通过一段时间内的连续输注施用),通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、舌下、滑膜内,通过吸入、椎管内、口内、吸入或局部途径。施用可以是全身性的(例如静脉施用)或局部的。可商业获得的用于液体制剂的喷雾器(包括喷射雾化器和超声喷雾器)适用于施用。液体制剂可直接喷雾,低压冻干粉末可以在重建后喷雾。或者,可以使用碳氟化合物制剂和压力定量气雾剂将抗CGRP拮抗剂抗体雾化,或作为低压冻干的和研细的粉末被吸入。在一个实施方案中,通过位点特异或靶向局部递送技术施用抗CGRP拮抗剂抗体。位点特异或靶向局部递送技术的例子包括抗CGRP拮抗剂抗体的多种可植入补给来源(depot sources)或局部递送导管,如输注导管、留置导管或套针、合成移植物、外膜覆膜(adventitial wraps)、分流器和支架或其它可植入的设备,位点特异的运载体、直接注射或直接应用。参阅例如PCT公开No. WO 00/53211和U.S. 专利No. 5,981,568。

[0126] 抗CGRP拮抗剂抗体的多种制剂可用于施用。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体可以单独施用。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体和可药用的赋形剂可存在于多种制剂中。可药用的赋形剂是本领域已知的并是相对惰性的物质,其有助于药理学有效物质的施用。例如,赋形剂可以有形状或稠度,或作为稀释剂作用。合适的赋形剂包括但不限于稳定剂、湿润剂和乳化剂、不同渗量的盐、包胶剂、缓冲液和皮肤穿透促进剂。赋形剂以及用

于肠胃外和非肠胃外药物递送的制剂公开于Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000) 中。

[0127] 在一些实施方案中, 这些试剂被配制为用于通过 (例如腹膜内、静脉内、皮下、肌内等) 注射施用。因此, 这些试剂可与可药用媒介如盐水、Ringer's 溶液、葡萄糖溶液等等组合。特定的给药方案 (即剂量、时间和重复) 将取决于特定的个体和该个体的医疗史。

[0128] 抗CGRP抗体可以使用任何合适的方法施用, 所述方法包括注射 (例如腹膜内、静脉内、皮下、肌内等)。抗CGRP抗体也可以如本文所述通过吸入施用。通常, 对于抗CGRP抗体的施用而言, 初始的候选剂量可以为约2mg/kg。就本发明的目的而言, 典型的每日剂量可以从约3 μ g/kg到30 μ g/kg到300 μ g/kg到3mg/kg, 到30mg/kg到100mg/kg或更多的范围内, 取决于上述因素。例如可使用约1mg/kg、约2.5mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg和约25mg/kg的剂量。对于在若干天或更久的重复施用而言, 根据病症持续治疗, 直到发生期望的症状抑制或直达到足够的治疗水平, 例如降低疼痛。示范性的给药方案包括施用约2mg/kg的初始剂量, 然后是约1mg/kg抗CGRP抗体的每周维持剂量, 或然后是每隔一周约1mg/kg的维持剂量。然而, 其它给药方法可以是有用的, 取决于医生希望达到的药物代谢动力学衰变模式。例如, 在一些实施方案中, 考虑一周一到四次的给药。该疗法的过程容易地通过常规技术和实验检测。给药方案 (包括使用的CGRP拮抗剂) 可随时间变化。

[0129] 就本发明的目的而言, 抗CGRP拮抗剂抗体的适当剂量取决于使用的抗CGRP拮抗剂抗体 (或其组合物)、待治疗的头痛 (例如偏头痛) 类型和严重性、试剂是否就预防或治疗的目的被使用、先前疗法、患者的医疗史和对试剂的应答, 以及主治医师的判断。典型地, 临床医师会施用抗CGRP拮抗剂抗体, 直到达到完成期望结果的剂量。剂量和/或频率可随治疗进程改变。

[0130] 经验性考虑 (例如半衰期) 通常有助于剂量的确定。例如, 与人免疫系统相容的抗体 (如人源化抗体或全人抗体) 可用于延长抗体的半衰期和预防抗体被宿主的免疫系统攻击。施用频率可随着治疗进程确定和调整, 并通常 (但非必须) 以头痛 (例如偏头痛) 的治疗和/或抑制和/或改善和/或延迟为基础。或者, 抗CGRP拮抗剂抗体的持久连续释放制剂可以是适当的。用于达到持久释放的多种制剂和设备是本领域已知的。

[0131] 在一个实施方案中, 可以按经验确定已经被给予一次或多次抗CGRP拮抗剂抗体施用的个体中抗CGRP拮抗剂抗体的剂量。个体被给予增加剂量的抗CGRP拮抗剂抗体。为了评估抗CGRP拮抗剂抗体的效力, 可依照该疾病的指征来进行。

[0132] 根据本发明方法的抗CGRP拮抗剂抗体的施用可以是连续的或间断的, 取决于例如受体的生理条件、施用目的是治疗性的还是预防性的, 以及熟练医生已知的其它因素。抗CGRP拮抗剂抗体的施用可以在预选的时间段中基本上是连续的, 或可以是一系列间隔的剂量, 例如发生头痛 (例如偏头痛) 之前、期间或之后之任一; 之前; 期间; 之前和之后; 期间和之后; 之前和期间; 或发生头痛之前、期间和之后。施用可以在可能引起头痛的任何事件之前、期间和/或之后。

[0133] 在一些实施方案中, 可存在多于一种抗CGRP拮抗剂抗体。可以存在至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少物种不同的或更多的抗CGRP拮抗剂抗体。通常这些抗CGRP拮抗剂抗体可以具有彼此不会不利影响的互补活性。拮抗剂抗CGRP抗体也可以用于与其它CGRP拮抗剂或CGRP受体拮抗剂结合。例如, 可使用一种或多种以下的CGRP拮抗剂: 针对CGRP

的抗反义分子(包括针对编码CGRP的核酸的抗反义分子)、CGRP抑制化合物、CGRP结构类似物、结合CGRP的CGRP受体的显性负相突变、抗CGRP受体抗体。抗CGRP拮抗剂抗体也可以与其它试剂结合使用,所述其它试剂起到增强和/或补充试剂有效性的作用。

[0134] 按下文所述,将根据本发明使用的抗CGRP拮抗剂抗体的治疗性制剂制备为低压冻干制剂或水性溶液的形式用于储存:将具有期望纯度的抗体与任选的可药用运载体、赋形剂或稳定剂混合(Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000))。可接受的运载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量上对于受体是无毒的,并可包含缓冲液如磷酸、柠檬酸和其它有机酸;盐如氯化钠;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化六甲双铵;氯化苄甲羟铵、氯化苄乙铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和m-甲酚);低分子量(少于约10个残基)的多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水多聚体如聚乙烯吡咯酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐的反例子如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0135] 通过本领域已知方法制备含有抗CGRP拮抗剂抗体的脂质体,所述方法例如描述于Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); 和U.S. Pat. Nos. 4,485,045和4,544,545中。具有增强的循环时间的脂质体公开于U.S. 专利No. 5,013,556中。尤其有用的脂质体可以通过反相蒸发法用脂质组合物产生,所述脂质组合物含有磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)。通过将脂质体滤过确定孔径的滤器得到具有期望直径的脂质体。

[0136] 在胶体给药系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或大乳剂中,活性成分也可以被捕获在微胶囊中例如分别被捕获在羟甲基纤维素或明胶微胶囊和多聚(methylmethacrylate)微胶囊中,所述微胶囊例如通过凝聚技术或通过界面聚合法制备。这类技术公开于Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)中。

[0137] 可制备缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水多聚体的半渗透性基质,所述基质是有形状物体(例如薄膜或微胶囊)的形式。缓释基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如多聚(2-羟乙基-异丁烯酯)或多聚(乙烯醇))、多聚乳酸化合物(U.S. Pat. No. 3,773,919)、L-谷氨酸共聚物和7-乙基-L-谷氨酸盐、非降解性的乙烯-醋酸乙烯酯、降解性的乳酸-羟乙酸共聚物如LUPRON DEPOT™(由乳酸-羟乙酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)、乙酸异丁酸蔗糖酯和多聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0138] 用于体内施用的配方必须是无菌的。这通过例如滤过无菌滤膜容易地实现。治疗性的抗CGRP拮抗剂抗体组合物通常被置于具有无菌接入口的容器(例如带有可被皮下注射针穿透的塞子的静脉注射溶液袋或瓶)中。

[0139] 根据本发明的组合物可以是用于口、肠胃外或直肠施用或通过吸入或吹入施用的单位剂型,如片剂、丸剂、胶囊、粉末、颗粒、溶液或悬浮液或栓剂。

[0140] 为了制备固体组合物如片剂,将主要的活性成分与药物运载体(例如常规的压片

成分,如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶)和其它药物稀释剂(例如水)混合,形成含有本发明化合物或其无毒可药用盐的均相混合物的固体预配制组合物。当提到这些预配制组合物是均相的时,表示活性成分遍及组合物被均一地分散,从而组合物可以被容易地再分为等效的单位剂型,如片剂、丸剂和胶囊。然后将该固体预配制组合物再分为上述类型的单位剂型,其含有从0.1到约500mg的本发明活性成分。新组合物的片剂或丸剂可以被包被或者以其它方式复合,得到给予长效的优点的剂型。例如,片剂或丸剂可以包含内部剂量和外部剂量组分,后者是前者上外膜的形式。这两种组分可以被肠道层分开,所述肠溶层(enteric layer)作用在于抵抗胃中的崩解并允许内部组分完整地进入十二指肠或被延迟释放。多种材料可被用于这类肠溶层或包衣,这类材料包括大量多聚酸和多聚酸与如紫胶、鲸蜡醇和醋酸纤维素类材料的混合物。

[0141] 合适的表面活性剂尤其包括:非离子型试剂,例如聚氧乙烯山梨聚糖(例如Tween™ 20、40、60、80或85)和其它山梨聚糖(例如Span™ 20、40、60、80或85)。含有表面活性剂的组合物应便利地包含0.05%和5%之间的表面活性剂,并可以在0.1%和2.5%之间。应当理解如果必需的话可添加其它成分,例如甘露醇或其它可药用的媒介。

[0142] 合适的乳剂可以使用可商业获得的脂肪乳剂来制备,所述脂肪乳剂例如Intralipid™、Liposyn™、Infonutrol™、Lipofundin™和Lipiphysan™。活性成分可被溶于预先混合的乳剂组合物中,或者其可溶于油(例如大豆油、红花油、棉籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)或通过将磷脂(例如卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)与水混合形成的乳剂中。应当理解可添加其它成分,例如甘油或葡萄糖,以调节乳剂的张力。合适的乳剂典型地含有多至20%的油,例如5%和20%之间。脂肪乳剂包含0.1和1.0 μ m之间、尤其是0.1和0.5 μ m之间的脂肪微滴,并具有5.5到8.0范围内的pH。

[0143] 乳剂组合物可以是通过将抗CGRP拮抗剂抗体与Intralipid™或其组分(大豆油、卵磷脂、甘油和水)混合制备的组合物。

[0144] 用于吸入或吹入的组合物包括在可药用的、水性或有机溶剂或其混合物中的溶液和悬浮液和粉末。液体或固体组合物可含有上文公开的合适的可药用赋形剂。在一些实施方案中,通过口或鼻呼吸途径施用组合物用于局部或全身作用。优选地在无菌可药用溶剂中的组合物可以通过使用气体被喷洒。被喷洒的溶液可以从喷雾设备直接被呼吸,或喷雾设备可以与面罩、帷罩或间歇性正压呼吸机结合。溶液、悬浮液或粉末组合物可以从以适当方式递送配方的设备中(优选口或鼻地)被施用。

[0145] 头痛的诊断或评估是本领域充分确定的。评估可以根据受试者测量(例如症状的患者特征)来确定。例如,偏头痛可以基于以下标准诊断:1)头痛的偶发性发作持续4到72个小时;2)具有两种以下症状:单侧疼痛、搏动、运动时加重,和中度或严重强度的疼痛;和3)以下症状之一:恶心或呕吐,和畏光或恐声(phonophobia)。Goadsby et al., N.Engl.J.Med.346:257-270,2002。

[0146] 治疗有效性可以通过本领域公知的方法评估。例如,可评估疼痛缓解。因此,在一些实施方案中,在施用抗CGRP抗体后1、2或几个小时后主观地观察到疼痛缓解。在一些实施方案中,在施用抗CGRP抗体后主观地观察头痛发作的频率。

[0147] B. 抗CGRP拮抗剂抗体

[0148] 本发明的方法使用抗CGRP拮抗剂抗体,所述CGRP拮抗剂抗体表示封闭、抑制或降

低(包括显著地)CGRP生物活性的任何抗体分子,所述生物活性包括由CGRP信号转导介导的下游途径,例如受体结合和/或对CGRP的细胞应答的激发。

[0149] 抗CGRP拮抗剂抗体应显示以下特征中的任一种或多种:(a)结合CGRP;(b)封闭CGRP与其受体结合;(c)封闭或降低CGRP受体活化(包括cAMP活化);(d)抑制CGRP生物活性或下调由CGRP信号转导功能介导的下游途径;(e)预防、改善或治疗头痛(例如偏头痛)的任何方面;(f)提高CGRP的清除率;和(g)抑制(减少)CGRP合成、生产或释放。抗CGRP拮抗剂抗体是本领域已知的。参阅例如Tan et al., Clin. Sci. (Lond) .89:565-73, 1995; Sigma (Missouri, US), 产品编号C7113(clone#4901); Plourde et al., Peptides 14:1225-1229, 1993。

[0150] 就本发明的目的而言,抗体与CGRP以下述方式反应,所述方式抑制CGRP和/或CGRP信号转导功能介导的下游途径。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体识别人CGRP。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体与人 α -CGRP和 β -CGRP均结合。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体与人和大鼠CGRP结合。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体结合具有CGRP的氨基酸25-37的C末端片段。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体结合CGRP的氨基酸25-37中的C末端表位。

[0151] 适用于本发明的抗体可包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc等)、嵌合抗体、双特异性抗体、杂缀合物抗体、单链(ScFv)、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白(例如结构域抗体)、人源化抗体,和免疫球蛋白分子的包含所需特异性的抗原识别位点的任何其它经修饰的构型,包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体和共价修饰的抗体。抗体可以是犬的、大鼠的、人的,或任何其它来源的(包括嵌合的或人源化的抗体)。

[0152] 在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体被人源化。在一些实施方案中,抗体是人的。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体是抗体G1(如本文所述)。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体包含表6所示抗体G1或G1变体的一个或多个CDR(例如一个、两个、三个、四个、五个或在一些实施方案中包含所有六个CDR)。还在其它实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体包含图5所示重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)和图5所示轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0153] 在一些实施方案中,抗体包含经修饰的恒定区,例如本文所述是免疫惰性的恒定区。在一些实施方案中,恒定区如Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; PCT申请No. PCT/GB99/01441; 和/或UK专利申请No. 9809951.8中所述被修饰。在其它实施方案中,抗体包含人重链IgG2恒定区,所述恒定区包含以下突变:A330P331到S330S331(参考野生型IgG2序列的氨基酸排序)。Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624。在一些实施方案中,抗体包含带有以下突变的IgG4恒定区:E233F234L235到P233V234A235。还在其它实施方案中,针对N连接的糖基化而言,恒定区不被糖基化(aglycosylated)。在一些实施方案中,通过突变寡糖附着残基(如Asn297)和/或侧翼残基(其为恒定区中N-糖基化识别序列的一部分),使得针对N连接的糖基化而言恒定区不被糖基化。在一些实施方案中,针对N连接的糖基化而言恒定区不被糖基化。可通过酶或通过糖基化缺陷宿主细胞中表达使得针对N连接的糖基化而言恒定区不被糖基化。

[0154] 抗CGRP拮抗剂抗体对CGRP(例如人 α -CGRP)的亲合力(K_D)可以是约0.02到约

200nM。在一些实施方案中,亲合力为下述任何:约200nM、约100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM、约60pM、约50pM、约20pM、约15pM、约10pM、约5pM或约2pM。在一些实施方案中,亲合力少于下述任何:约250nM、约200nM、约100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM或约50pM。

[0155] 测定抗体对CGRP的亲合力的一种方式是通过测量抗体的单功能Fab片段的亲合力。为了获得单功能的Fab片段,可以用木瓜蛋白酶切割抗体(例如IgG)或重组表达。可以通过装备有固定的链霉亲和素感受芯片(SA)的表面等离子共振(Biacore3000TM表面等离子共振(SPR)系统,Biacore,INC,Piscataway NJ)使用HBS-EP电泳缓冲液(0.01M HEPES,pH 7.4、0.15NaCl、3mM EDTA、0.005%v/v表面活性剂P20)测定抗体的抗CGRP Fab片段的亲和力。可以在HBS-EP缓冲液中将生物素化的人CGRP(或任何其它CGRP)稀释为少于0.5ug/mL的浓度,并使用不同的接触时间将其注射越过个体芯片通道,以达到两种范围的抗原密度:用于详细动力学研究的50-200响应单位(RU)或用于筛选实验的800-1,000RU。再生研究显示25%v/v乙醇中25mM NaOH有效地去除了结合的Fab同时维持芯片上多于200个注射的CGRP活性。典型地,将纯化的Fab样品的连续稀释(针对0.1-10x评估的K_D的浓度)以100μL/分钟注射1分钟,并允许至多2小时的解离时间。通过ELISA和/或SDS-PAGE电泳,使用已知浓度的Fab(通过氨基酸分析测定)作为标准测定Fab蛋白质的浓度。使用BIAevaluation程序,通过将数据整体与1:1 Langmuir结合模型(Karlsson,R.Roos,H.Fagerstam,L.Petersson,B.(1994).Methods Enzymology 6.99-110)拟合,同时获得动力学结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(K_D)值作为k_{off}/k_{on}计算。该方案适用于测定抗体对任何CGRP的亲合力,所述CGRP包括人CGRP、另一哺乳动物的CGRP(例如小鼠CGRP、大鼠CGRP、灵长类CGRP)以及不同形式的CGRP(例如α和β形式)。抗体的亲合力通常在25℃下测量,但是也可以在37℃测量。

[0156] 可以通过本领域已知的任何方法来制造抗CGRP拮抗剂抗体。免疫宿主动物的途径和时间表通常与如本文所进一步描述的、用于抗体刺激和生产的、确定的和常规的技术一致。用于生产人和小鼠抗体的一般技术是本领域已知的并在本文被描述了。

[0157] 本发明包括:任何哺乳动物受试者(包括人)或来自其中的生产抗体的细胞可以被加工,用作生产哺乳动物(包括人)杂交瘤细胞系的基础。典型地,用一定量的免疫原(包括本文所述的免疫原)腹膜内、肌内、口、皮下、脚掌内和/或皮内接种宿主细胞。

[0158] 可以使用Kohler,B.and Milstein,C.(1975)Nature 256:495-497的或被Buck,D.W.,et al.,In Vitro,18:377-381(1982)修饰的一般体细胞杂交技术,从淋巴细胞和无限增殖化骨髓瘤细胞制备杂交瘤。可以获得的骨髓瘤株系(包括但不限于X63-Ag8.653和来自SaIk Institute,Cell Distribution Center,San Diego,Calif.,美国的骨髓瘤株系)可用于杂交中。通常,该技术涉及使用本领域技术人员已知的促融剂(如聚乙二醇)或通过电手段融合骨髓瘤细胞和淋巴细胞。融合后将细胞从融合培养基中分离并在选择性生长培养基如次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶(HAT)培养基上培养,以消除未杂交的亲本细胞。可用本文所述的补充了血清或未补充血清的任何培养基来培养分泌单克隆抗体的杂交瘤。作为细胞融合技术的另一选择,可以使用EBV无限增殖化B细胞生产本发明的抗CGRP单克隆抗体。如果需要,将杂交瘤扩展并亚克隆,并通过常规免疫测定步骤(例如放射免疫测定、酶免疫测定或荧光免疫测定)来测试上清液的抗免疫原活性。

[0159] 可用作抗体来源的杂交瘤包括生产对CGRP特异的单克隆抗体或其部分的亲本杂交瘤的所有衍生的后代细胞。

[0160] 可以使用已知步骤体外或体内培养生产这类抗体的杂交瘤。如果需要的化,可以通过常规免疫球蛋白纯化步骤(如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、色谱法和超滤)从培养基或体液中分离单克隆抗体。如果存在不期望的活性,可例如通过将制剂流过吸附剂并将期望的抗体从免疫原上洗脱或释放来去除,所述吸附剂由附着在固相上的免疫原组成。用人CGRP或含有靶氨基酸序列的片段免疫宿主动物能够得到一群抗体(例如单克隆抗体),所述靶氨基酸序列使用双功能试剂或衍生试剂与在要免疫的物种中是免疫原性的蛋白质缀合,所述蛋白质例如钥孔虫咸血蓝素(keyhole limpet hemocyanin)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂,所述双功能试剂或衍生试剂例如马来酰亚胺苯甲酰琥珀酰亚胺(maleimidobenzoyl sulfosuccinimide)酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺酯(通过赖氨酸残基)、丙烯醛、琥珀酸酐、SOCl₂或R₁N=C=NR,其中R或R₁是不同的烷基。

[0161] 如果需要的话,可以对感兴趣的抗CGRP拮抗剂抗体(单克隆或多克隆)进行测序,随后可将多核苷酸序列克隆进载体中用于表达或繁殖。编码感兴趣的抗体的序列可以在宿主细胞中的载体中维持,然后可以将宿主细胞扩展或冷冻用于进一步的用途。或者,可将多核苷酸序列用于遗传操作,以“人源化”抗体或改善抗体的亲和力或其它特性。例如,恒定区可以被改造得更像人恒定区,从而如果抗体被用于临床试验和在人中治疗时避免免疫应答。可以期望遗传改造抗体序列,以获得对CGRP的更大亲和力和在抑制CGRP中的更强效力。本领域技术人员应当明白,可以对抗CGRP拮抗剂抗体进行一个或多个多核苷酸改变并仍然维持其对CGRP的结合能力。

[0162] 人源化单克隆抗体存在四个一般步骤。这些步骤为:(1)确定初始抗体轻和重可变结构域的核苷酸和预测的氨基酸序列(2)设计人源化抗体,即决定在人源化过程中使用何种抗体框架区(3)实际的人源化方法/技术和(4)人源化抗体的转染和表达。参阅例如U.S.专利Nos.4,816,567、5,807,715、5,866,692、6,331,415、5,530,101、5,693,761、5,693,762、5,585,089和6,180,370。

[0163] 包含来自于非人免疫球蛋白的抗原结合位点的大量“人源化”抗体分子已经被描述过,包括下述嵌合抗体,所述嵌合抗体具有与人恒定区融合的啮齿动物V区或经修饰的啮齿动物V区以及它们结合的互补性决定区(CDR)。参阅例如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)和Brown et al.Cancer Res.47:3577-3583(1987)。其它参考文献描述了在与适当的人抗体恒定区融合之前移植进人支持框架区(FR)的啮齿动物CDR。参阅例如Riechmann et al.Nature 332:323-327(1988),Verhoeyen et al.Science 239:1534-1536(1988)和Jones et al.Nature 321:522-525(1986)。另一参考文献描述了被重组修饰的啮齿动物框架区支持的啮齿动物CDR。参阅例如欧洲专利申请No.0519596。这些“人源化”分子被设计为最小化对啮齿动物抗人抗体分子的不期望的免疫应答,所述免疫应答限制了这些部分在人受体中治疗性应用的持续时间和有效性。例如,可以工程改造抗体恒定区,使得其为免疫惰性的(例如不引发补体裂解)。参阅例如PCT公开No.PCT/GB99/01441;UK专利申请No.9809951.8。还可以使用的人源化抗体的其它方法由

Daugherty et al., Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 (1991) 和 U.S. 专利 Nos. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; 5,866,692; 6,210,671 和 6,350,861 和 PCT 公开 No. WO 01/27160 中公开。

[0164] 再或者, 可以通过使用可商业获得的小鼠获得完全的人抗体, 所述小鼠已经被工程改造为表达特异的人免疫球蛋白蛋白质。被设计为生产更期望的 (例如完全人抗体) 或更有活力的免疫应答的转基因动物也可以用于产生人源化的抗体或人抗体。这类技术的例子为来自 Abgenix, Inc. (Fremont, CA) 的 XenomouseTM 和来自 Medarex, Inc. (Princeton, NJ) 的 TCMouseTM。

[0165] 或者, 可以使用本领域已知的任何方法重组制造和表达抗体。又或者, 可以通过噬菌体展示技术重组制造抗体。参阅例如 U.S. 专利 Nos. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 和 6,265,150; 和 Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994)。或可以使用噬菌体展示技术 (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) 从来自未免疫的供体的免疫球蛋白可变 (V) 结构域基因仓库中体外生产人抗体和抗体片段。根据该技术, 将抗体 V 结构域在读码框内克隆进丝状噬菌体 (如 M13 或 fd) 的主要或次要外壳蛋白中, 并作为噬菌体颗粒表面上的功能性抗体片段展示。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝, 所以基于抗体功能特征的选择也导致选择编码显示这些特征的抗体的基因。因此, 噬菌体模拟 B 细胞的一些特征。噬菌体展示可以以多种形式进行; 综述参阅例如 Johnson, Kevin S. and Chisweli, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)。可以使用若干种来源的 V 基因区段用于噬菌体展示。Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) 从来自免疫小鼠脾中的 V 基因小量随机组合文库中分离的不同的抗噁唑酮抗体阵列。基本依照 Mark et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) 或 Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993) 所述的技术可以构建来自未免疫的人供体的 V 基因仓库并分离针对不同抗原 (包括自身抗原) 阵列的抗体。天然免疫应答中, 抗体基因以高速率累积突变 (体细胞高度突变)。一些引入的改变会赋予更高的亲和力, 并且在随后的抗原激发中优先地复制和分化展示高亲和力表面免疫球蛋白的 B 细胞。可以通过使用已知为“链改组 (chain shuffling)” (Marks, et al., Bio/Technol. 10:779-783 (1992)) 的技术模拟该天然过程。在该方法中, 通过噬菌体展示获得的“原始”人抗体的亲和力可以如下被改进: 用得自未免疫的供体的 V 结构域基因天然存在的变体仓库 (仓库) 连续地置换重链和轻链的 V 区域基因。该技术允许生产具有 pM-nM 范围内亲和力的抗体和抗体片段。制造非常大的噬菌体抗体仓库 (也已知为“所有之母文库 (the mother-of-all libraries)”) 的策略已经由 Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21:2265-2266 (1993) 描述。基因改组也可以用于从啮齿动物抗体中衍生人抗体, 其中人抗体具有与初始的啮齿动物抗体相似的亲和力和特异性。根据该方法 (其也被称作“表位印记”), 通过噬菌体展示技术获得的啮齿动物抗体的重链或轻链 V 结构域基因被置换为人 V 结构域基因仓库, 创建了啮齿动物-人嵌合体。在抗原上的选择导致能够重建功能性抗原结合位点 (即表位支配 (印记) 配偶体的选择) 的人可变区的分离。重复该过程从而置换剩余的啮齿动物 V 结构域时, 获得人抗体 (参阅 1993 年四月 1 日公开的 PCT 公开 No. WO 93/06213)。与通过 CDR 移植对啮齿动物抗体的常规人源化不同, 该技术提供了完全的人抗体, 其不具有啮齿动物来源的框架或 CDR 残基。

[0166] 显然, 尽管上文的讨论仅涉及人源化的抗体, 但是所讨论的一般性原则适用于定

制用于例如犬、猫、灵长类、马和牛的抗体。还显而易见的是本文所述的人源化抗体的一个或多个方面(例如CDR移植、框架突变和CDR突变)可以组合。

[0167] 可按下文所述来重组制造抗体:首先将生产多种抗体或一种抗体的细胞从宿主动物中分离,获得基因序列,并使用该基因序列在宿主细胞(例如CHO细胞)中重组表达抗体。可使用的另一方法是在植物(例如烟草)或转基因乳中表达抗体序列。用于在植物或乳中重组表达抗体的方法已经被公开。参阅例如Peeters,et al.Vaccine 19:2756 (2001); Lonberg,N.and D.Huszar Int.Rev.Immunol 13:65 (1995);和Pollock,et al.,J Immunol Methods 231:147 (1999)。用于制造抗体衍生物(例如人源化的、单链的等)的方法是本领域已知的。

[0168] 免疫测定和流式细胞分选技术如荧光激活细胞分选术(FACS)也可以用于分离对CGRP特异的抗体。

[0169] 抗体可以结合与许多不同的运载体结合。运载体可以是活性的和/或惰性的。公知的运载体的例子包括聚丙烯、聚苯乙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、玻璃、天然和经修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁石。就本发明的目的而言,运载体的特性可以是可溶的或不溶的。本领域技术人员会直到用于结合抗体的其它合适运载体,或应该能够使用常规实验确定。在一些实施方案中,运载体包括靶向心肌膜的部分。

[0170] 容易使用常规步骤(例如通过使用能够特异结合下基因基因的寡核苷酸探针,所述基因编码单克隆抗体的重链和轻链)对编码单克隆抗体的DNA进行分离和测序。杂交瘤细胞左右这类DNA优选的来源作用。一旦被分离,可以将DNA置于表达载体(例如PCT公开No.WO 87/04462中公开的表达载体)中,然后将其转染进宿主细胞中获得重组宿主细胞中单克隆抗体的合成,所述宿主细胞例如以其它方式不生产免疫球蛋白蛋白质的大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞。参阅例如PCT公开No.WO 87/04462。DNA也可以被修饰,例如通过将同源鼠序列位置替换为人重链和轻链恒定结构域的编码序列(Morrison et al.,Proc.Nat.Acad.Sci.81:6851 (1984)),或通过将编码非免疫球蛋白多肽的序列的全部或部分与免疫球蛋白编码序列共价接合。以该方式制备“嵌合的”或“杂交的”抗体,其具有本文的抗CGRP单克隆抗体的结合特异性。

[0171] 可以使用本领域已知的方法鉴定或表征来自抗体的抗CGRP拮抗剂抗体和多肽,从而探测和/或测量CGRP生物活性的降低、缓和或中和。例如,也可以通过将候选试剂与CGRP孵育并监测任一种或多种以下特性来鉴定抗CGRP拮抗剂抗体:(a)结合CGRP;(b)封闭CGRP与其受体结合;(c)封闭或降低CGRP受体活化(包括cAMP活化);(d)抑制CGRP生物活性或由CGRP信号转导功能介导的下游途径;(e)预防、改善或治疗头痛(例如偏头痛)的任何方面;(f)提高CGRP的清除率;和(g)抑制(减少)CGRP合成、生产或释放。在一些实施方案中,通过将候选试剂与CGRP孵育并监测CGRP的结合和/或伴随的生物活性降低或中和来鉴定抗CGRP拮抗剂抗体或多肽。可以用经纯化的CGRP多肽,或用天然表达CGRP多肽或被转染以表达CGRP多肽的细胞进行结合测定。在一个实施方案中,结合测定是竞争性的结合测定,其中评价候选抗体与已知抗CGRP拮抗剂竞争结合CGRP的能力。该测试可以以多种形式进行,包括ELISA形式。在其它实施方案中,通过将候选试剂与CGRP孵育,并监测结合和伴随的对细胞表面上表达的CGRP受体活化抑制来鉴定抗CGRP拮抗剂抗体。

[0172] 在最初的鉴定后,可以通过生物测定进一步证实和精制候选抗CGRP拮抗剂抗体的

活性,所述生物测定已知用于检验靶向的生物活性。或者,可以使用生物测定直接筛选候选者。例如,CGRP促进响应细胞中大量可测量的改变。这些改变包括但不限于:细胞(例如SK-N-MC细胞)中cAMP的刺激。也可以使用动物模型测量拮抗剂活性,例如测量由刺激大鼠隐神经诱导的皮肤血管扩张。Escott et al.,Br.J.Pharmacol.110:772-776,1993。可进一步使用头痛(例如偏头痛)的动物模型检验拮抗剂抗体或多肽的效力。Reuter,et al.,Functional Neurology (15) Suppl.3,2000。用于鉴定和表征抗CGRP拮抗剂抗体的方法中的一些在实施例中详细描述。

[0173] 可以使用本领域公知的方法表征抗CGRP拮抗剂抗体。例如,一种方法是鉴定其结合的表位,或“表位作图”。存在本领域已知的用于对蛋白质上的表位位置作图和表征的许多方法,包括解答抗体-抗原复合物的晶体结构、竞争测定、基因片段表达测定,和基于合成肽的测定,例如描述于Chapter 11 of Harlow and Lane,Using Antibodies,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1999中。在额外的例子中,可使用表位作图确定抗CGRP拮抗剂抗体结合的序列。表位作图可以从多种来源商业获得,例如Pepscan Systems (Edelhertweg 15,8219PH Lelystad,荷兰)。表位可以是线性表位(即包含在单链氨基酸中)或通过氨基酸的三维相互作用形成的构型表位(其不必须包含在单链中)。多种长度(例如至少4-6个氨基酸长)的肽可以被分离或(例如重组地)合成,并用于与抗CGRP拮抗剂抗体的结合测定中。在另一例子中,抗CGRP拮抗剂抗体结合的表位可以通过使用来自CGRP序列的重叠肽并测定抗CGRP拮抗剂抗体的结合而在系统性筛选中确定。根据基因片段表达测定,随机地或通过特异的遗传构建使编码CGRP的开放读码框成为片段,并测定待所表达的CGRP片段与待检验的抗体的反应性。例如可以通过PCR生产基因片段,随后在存在放射性氨基酸的情况下体外转录和翻译为蛋白质。然后通过免疫沉淀和凝胶电泳测定抗体与放射性标记的CGRP片段的结合。也可以通过使用在噬菌体颗粒表面上展示的随机肽序列文库(噬菌体文库)鉴定某些表位。或者,可以在简单的结合测定中测试确定的重叠肽片段文库对测试抗体的结合。在一个额外的例子中,可以进行抗原结合结构域诱变、结构域切换实验和丙氨酸扫描诱变,来鉴定表位结合所需的、充分的和/或必要的残基。例如,可以使用突变体CGRP进行结构域切换实验,其中CGRP多肽的多个片段已经被置换(切换)为来自密切相关的、但是抗原性不同的蛋白质(例如神经营养因子蛋白质家族的另一成员)的序列。可以通过评估抗体与突变体CGRP的结合,来评估特定CGRP片段对抗体结合的重要性。

[0174] 可用于表征抗CGRP拮抗剂抗体的又一方法是使用竞争测定法(其使用已知结合相同抗原的其它抗体,即CGRP上的多个片段)来确定抗CGRP拮抗剂抗体是否与其它抗体结合相同的表位。竞争测定法是本领域技术人员公知的。

[0175] 可以使用表达载体来指导抗CGRP拮抗剂抗体的表达。本领域技术人员熟悉使用表达载体体内获得外源蛋白质的表达。参阅例如U.S.专利Nos.6,436,908;6,413,942;和6,376,471。表达载体的施用包括局部或全身施用,包括注射、口施用、基因枪或插入导管施用和局部施用。在另一实施方案中,表达载体被直接施用至交感干或神经节,或施用进冠状动脉、心房、脑室或心包中。

[0176] 也可以使用含有表达载体或亚基因组多核苷酸的治疗性组合物的定向递送。受体介导的DNA递送技术描述于例如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 中。在基因治疗方案中, 对局部施用而言, 含有多核苷酸的治疗性组合物在约 100mg 到约 200mg DNA 的范围内被施用。在基因治疗方案中也可以使用约 500ng 到约 50mg、约 1 μ g 到约 2mg、约 5 μ g 到约 500 μ g 和约 20 μ g 到约 100 μ g DNA 范围内的浓度。可以使用基因递送媒介递送治疗性多核苷酸和多肽。基因递送媒介可以是病毒或非病毒来源的(一般参阅 Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; 和 Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148)。这类编码序列的表达可以使用内源哺乳动物或异源启动子诱导。编码序列的表达可以是组成型的或受调节的。

[0177] 用于递送期望的多核苷酸并在期望的宿主细胞中表达的、基于病毒的载体是本领域公知的。示范性的基于病毒的媒介包括, 但不限于重组的逆转录病毒(参阅例如 PCT 公开 Nos. WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; U.S. 专利 Nos. 5,219,740 和 4,777,127; GB 专利 No. 2,200,651; 和 EP 专利 No. 0345 242)、基于 α 病毒的载体(例如 Sindbis 病毒载体、Semliki 森林病毒 (ATCC VR-67; ATCC VR-1247) 罗斯河病毒 (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) 和 Venezuelan 马脑炎病毒 (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR1249; ATCC VR-532)) 和腺伴随病毒 (AAV) 载体(参阅例如 PCT 公开 Nos. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 和 WO 95/00655)。也可以使用如 Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147 中所述的与杀死的腺病毒连接的 DNA 的施用。

[0178] 也可以使用非病毒的递送媒介和方法, 包括但不限于与杀死的腺病毒单独连接或不连接的聚阳离子凝缩的 DNA (参阅例如 Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); 配体连接的 DNA (参阅例如 Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); 真核细胞递送媒介细胞(参阅例如 U.S. 专利 No. 5,814,482; PCT 公开 Nos. WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; 和 WO 97/42338) 和核电荷中和或与细胞膜融合。也可以使用裸 DNA。示范性的裸 DNA 引入方法描述于 PCT 专利 No. WO 90/11092 和 U.S. 专利 No. 5,580,859 中。可作为基因递送媒介作用的脂质体描述于 U.S. 专利 No. 5,422,120; PCT 公开 Nos. WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; 和 EP0524968 中。其它途径描述于 Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411, 和 Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581 中。

[0179] C. 抗体 G1 和相关抗体、多肽、多核苷酸、载体和宿主细胞

[0180] 本发明包括组合物(包括药物组合物), 所述组合物包含表 6 所示的抗体 G1 及其变体, 或来自表 6 所示抗体 G1 及其变体的多肽; 和包含编码抗体 G1 及其变体或多肽的序列的多核苷酸。本文使用组合物包括与 CGRP 结合的一种或多种抗体或多肽(其可以是或不适抗体)和/或一种或多种多核苷酸, 所述多核苷酸包含编码与 CGRP 结合的一种或多种抗体或多肽的序列。这些组合物可进一步包含本领域公知的合适赋形剂, 如可药用的赋形剂(包括缓冲液)。

[0181] 本发明的抗 CGRP 拮抗剂抗体和多肽通过以下任何(一种或多种)特征表征: (a) 结合 CGRP; (b) 封闭 CGRP 与其受体结合; (c) 封闭或降低 CGRP 受体活化(包括 cAMP 活化); (d) 抑

制CGRP生物活性或下调由CGRP信号转导功能介导的下游途径；(e) 预防、改善或治疗头痛（例如偏头痛）的任何方面；(f) 提高CGRP的清除率；和 (g) 抑制（减少）CGRP合成、生产或释放。

[0182] 因此，本发明提供以下之任何，或包含以下之任何的组合物（包括药物组合物）：(a) 表6所示抗体G1或其变体；(b) 表6所示抗体G1或其变体的片段或区域；(c) 表6所示抗体G1或其变体的轻链；(d) 表6所示抗体G1或其变体的重链；(e) 来自表6所示抗体G1或其变体轻链和/或重链的一个或多个可变区；(f) 来自表6所示抗体G1或其变体的一个或多个CDR（一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR）；(g) 来自抗体G1重链的CDR H3；(h) 来自表6所示抗体G1或其变体轻链的CDR L3；(i) 来自表6所示抗体G1或其变体轻链的三个CDR；(j) 来自表6所示抗体G1或其变体重链的三个CDR；(k) 来自表6所示抗体G1或其变体轻链的三个CDR和重链的三个CDR；和 (l) 包含从 (b) 到 (k) 中任一项的抗体。本发明还提供了包含上述之一或多个的多肽。

[0183] 抗体G1的CDR部分（包括Chothia和Kabat的CDR）在图5中图解说明。CDR区的确定属于本领域的技术。应理解在一些实施方案中，CDR可以是Kabat和Chothia CDR的组合（也称作“组合CDR”或“扩展的CDR”）。在一些实施方案中，CDR是Kabat CDR。在其它实施方案中，CDR是Chothia CDR。换言之，在有多于一种CDR的实施方案中，CDR可以是Kabat、Chothia、组合CDR之任何或其组合。

[0184] 在一些实施方案中，本发明提供了下述多肽（其可以是或不是抗体），所述多肽包含至少一个CDR、至少两个、至少三个、或至少四个、至少五个、或至少所有六个CDR，所述CDR与表6所示G1或其变体的至少一个CDR、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或所有六个CDR基本相同。其它实施方案包括具有至少两个、三个、四个、五个或六个CDR的抗体，所述CDR与G1的或来自G1的至少两个、三个、四个、五个或六个CDR基本相同。在一些实施方案中，所述至少一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR与表6所示G1或其变体的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR为至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。应理解：就本发明的目的而言，结合特异性和/或总体活性通常恒定，尽管活性程度与表6所示G1或其变体相比可改变（可以更大或更小）。

[0185] 本发明还提供了一种多肽（其可以是或不是抗体），所述多肽包含表6所示G1或其变体的氨基酸序列，所述氨基酸具有以下之任何：表6所示G1或其变体序列的至少5个连续氨基酸、至少8个连续氨基酸、至少约10个连续氨基酸、至少约15个连续氨基酸、至少约20个连续氨基酸、至少约25个连续氨基酸、至少约30个连续氨基酸，其中至少三个氨基酸来自表6所示G1或其变体的可变区（图5）。在一个实施方案中，可变区来自G1的轻链。在另一实施方案中，可变区来自G1的重链。示范性的多肽具有来自G1重链和轻链二者可变区的连续氨基酸（长度如上所述）。在另一实施方案中，5个（或更多的）连续氨基酸来自图5所示的G1的互补性决定区（CDR）。在一些实施方案中，连续氨基酸来自G1的可变区。

[0186] 抗CGRP拮抗剂抗体和多肽对CGRP（例如人 α -CGRP）的亲合力 (K_D) 可以是约0.06到约200nM。在一些实施方案中，亲合力为约200nM、100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM、约60pM、约50pM、约20pM、约15pM、约10pM、约5pM或约2pM之任何。在一些实施方案中，亲合力少于约250nM、约200nM、约100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM或约50pM之任何。

[0187] 本发明还提供了制造任何这些抗体或多肽的方法。可以通过本领域已知的步骤来制造本发明的抗体。可以通过抗体的蛋白水解或其它降解,通过如上所述的重组方法(即单个或融合的多肽)或通过化学合成来生产多肽。抗体的多肽,特别是最多约50个氨基酸的较短多肽,通过化学合成被便利地制造。化学合成的方法是本领域已知的,并可商业获得。例如,可以通过自动多肽合成仪使用固相方法生产抗体。也参阅U.S. 专利Nos. 5,807,715; 4,816,567; 和6,331,415。

[0188] 又或者,可使用本领域公知的步骤重组制造抗体。在一个实施方案中,多核苷酸包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示编码抗体G1的重链和/或轻链可变区的序列。在另一实施方案中,包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示核苷酸序列的多核苷酸被克隆进一个或多个载体中用于表达或繁殖。编码感兴趣的抗体的序列可以在宿主细胞中维持于载体中,然后可以将宿主细胞扩展或冰冻用于将来的用途。载体(包括表达载体)和宿主细胞在本文进一步描述。

[0189] 本发明还包括本发明抗体(如G1)的单链可变区片段("scFv")。G1单链可变区片段通过使用短连接肽将轻链和/或重链的可变区连接制造。Bird et al. (1988) Science 242: 423-426。连接肽的一个例子是(GGGGS)₃,其在一个可变区的羧基端和其它可变区的氨基端之间连接大约3.5nm。已经设计和使用其它序列结构。Bird et al. (1988)。接头随后可以被修饰具有额外的功能,例如与药物结合或与固体支持物结合。可以重组地或合成地生产单链变体。对于scFv的合成生产而言,可以使用自动化合成仪。对于scFv的重组生产而言,可以将含有编码scFv的多核苷酸的合适质粒引入合适的宿主细胞中,所述宿主细胞为真核(如酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞)或原核(如大肠杆菌)的。编码感兴趣的scFv的多核苷酸可以通过常规操作如多核苷酸的连接来制造。可以使用本领域已知的标准蛋白质纯化技术分离得到的scFv。

[0190] 本发明还也包括其它形式的单链抗体如双体。双体为二价的、双特异性的抗体,其中VH和VL结构域在单多肽链上表达,但是使用的接头太短而不允许相同链上两个结构域之间配对,从而迫使该结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(参阅例如Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123)。

[0191] 例如,双特异性抗体、对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体可以使用本文公开的抗体制备。用于制造双特异性抗体的方法是本领域已知的(参阅例如Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121:210)。传统上,双特异性抗体的重组生产是以两种免疫球蛋白重链-轻链对的共表达为基础的,其中两个重链具有不同的特异性(Millstein and Cuello, 1983, Nature 305, 537-539)。

[0192] 根据制造双特异性抗体的一种途径,将具有期望的结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变区结构域与免疫球蛋白恒定区序列融合。该融合物优选带有免疫球蛋白重链恒定结构域,其包含至少一部分铰链,CH2和CH3区。优选第一重链恒定区(CH1)存在于至少一个融合物中,所述恒定区含有轻链结合必需的位点。编码免疫球蛋白重链融合物和期望时编码免疫球蛋白轻链的DNA被插入独立的表达载体中,并转染进合适的宿主生物中。这提供了在下述实施方案中调节三个多肽片段相互间比例的巨大灵活性,所述实施方案的构建中等比例的三种多肽链的使用得到最适的产率。然而,当等比例的至少两种多肽链导致

高产率时,或当比例不具特别的重要性时,可能将两种或三种多肽链插入一个表达载体中。

[0193] 在一种途径中,双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂种免疫球蛋白重链与另一臂上的杂种免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二种结合特异性)组成。该不对称的结构(免疫球蛋白轻链仅在双特异性分子的一半中)便于将期望的双特异性化合物从不期望的免疫球蛋白链组合中分离。该途径描述于1994年3月3日公开的PCT公开No.WO 94/04690。

[0194] 包含两种共价连接的抗体的杂缀合物抗体也在本发明的范围内。这类抗体已经被用于将免疫系统细胞靶向不期望的细胞(U.S.专利No.4,676,980)和用于治疗HIV感染(PCT申请公开Nos.WO 91/00360和WO 92/200373;EP 03089)。杂缀合物抗体可以使用任何便利的交联方法制造。合适的交联剂和技术是本领域公知的,并被描述于U.S.专利No.4,676,980中。

[0195] 也可以使用已知的合成蛋白质化学体外制备嵌合抗体或杂种抗体,包括涉及交联剂的化学。例如,可以使用二硫化物交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于该目的合适试剂包括亚氨基硫醇(iminothiolate)和甲基-4-巯基丁基咪唑(mercaptobutyrimidate)。

[0196] 可以使用任何本领域已知的方法制造人源化的抗体,其包含表6所示抗体G1或其变体的一种或多种CDR,或衍生自表6所示抗体G1或其变体的一种或多种CDR。例如,可使用四个一般步骤人源化单克隆抗体。

[0197] 本发明包括对表6所示抗体G1或其变体的修饰,包括不显著影响其特性的功能等效抗体和具有增强的或降低的活性和/或亲合力的变体。例如,表6所示抗体G1或其变体的氨基酸序列可以被突变,以获得具有期望的对CGRP亲合力的抗体。多肽的修饰是本领域的常规实践并不需要在本文详细描述。多肽的修饰在实施例中例证。经修饰的多肽的例子包括下述多肽,所述多肽具有氨基酸残基保守取代、一个或多个氨基酸删除或添加(其不显著有害地改变功能活性)、或化学同系物的使用。

[0198] 氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基端融合(其长度范围从一个残基到含有一百或更多个残基的多肽),以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N末端甲二磺酰残基的抗体或与表位标签融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括酶或多肽与抗体N端或C端的融合,其提高抗体的血清半衰期。

[0199] 取代变体是抗体分子中至少一个氨基酸残基被去除并在其位置中插入不同的残基。用于取代诱变的最感兴趣的位点包括超变区,但是也考虑FR变更。保守取代在题目“保守取代”下显示于表1中。如果这类取代导致生物活性的改变,则可引入更多的重大改变(在表1中称作“示范性取代”)或如下关于氨基酸家族所进一步描述的改变。

[0200] 表1:氨基酸取代

[0201]

原始残基	保守性取代	示范性取代
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; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸

[0202] 抗体生物特征中的取代修饰通过选择取代来完成,所述取代维持(a)取代区域中多肽主链结构,例如片层或螺旋构象,(b)分子靶位点处的电荷或疏水性,或(c)侧链体积的作用有显著差异。天然存在的残基根据常见的侧链特征被分组:

[0203] (1) 非极性的:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0204] (2) 极性不带电:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0205] (3) 酸性(带负电):Asp、Glu;

[0206] (4) 碱性(带正电):Lys、Arg;

[0207] (5) 影响链方向的残基:Gly、Pro;和

[0208] (6) 芳香族的:Trp、Tyr、Phe、His。

[0209] 可以通过将这些种类之一的成员与另一种类交换进行非保守性取代。

[0210] 任何不涉及维持抗体适当构型的半胱氨酸残基也可以被取代(通常用丝氨酸)以促进分子的氧化稳定性并阻止异常交联。相反,可以对抗体添加半胱氨酸键以促进其稳定性,特别是当抗体是抗体片段例如Fv片段时。

[0211] 氨基酸修饰的范围从改变或修饰一个或多个氨基酸到完全重新设计一个区域,如可变区。可变区中的改变可改变亲合力和/或特异性。在一些实施方案中,在CDR结构域中制造不多于一个到五个保守的氨基酸取代。在其它实施方案中,在CDR结构域中制造不多于一个到三个保守的氨基酸取代。还在其它实施方案中,CDR结构域为CDR H3和/或CDR L3。

[0212] 修饰还包括糖基化的和未糖基化的多肽,以及带有其它翻译后修饰的多肽,例如用不同的糖糖基化、乙酰化和磷酸化。抗体在它们的恒定区中保守的位置被糖基化

(Jefferis and Lund, 1997, *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright and Morrison, 1997, *TibTECH* 15:26-32)。免疫球蛋白的寡糖侧链影响蛋白质的功能(Boyd et al., 1996, *MoI. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, *Biochem.* 29:4175-4180)和糖蛋白部分之间的分子内相互作用,这可影响糖蛋白的构象和所表现的三维表面(Hefferis and Lund, *supra*; Wyss and Wagner, 1996, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416)。

[0213] 寡糖也可以作用于将给定的糖蛋白靶向基于特异识别结构的某些分子。抗体的糖基化也被报导为影响抗体依赖性的细胞毒性(ADCC)。特别地,具有四环素调节的 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III(GnTIII)(一种催化二等分GlcNAc形成的糖基转移酶)表达的CHO细胞被报导为具有改进的ADCC活性(Umana et al., 1999, *Mature Biotech.* 17:176-180)。

[0214] 典型地,抗体的糖基化是N连接的或O连接的。N连接是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链结合。天冬酰胺-X-丝氨酸、天冬酰胺-X-苏氨酸和天冬酰胺-X-半胱氨酸的三肽序列是碳水化合物部分与天冬酰胺侧链酶结合的识别序列,其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸。因此,多肽中这些三肽序列的存在创建了可能的糖基化位点。O连接的糖基化是指N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟基氨基酸的结合,所述羟基氨基酸最经常为丝氨酸或苏氨酸,尽管也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0215] 对抗体添加糖基化位点如下文所述便利地完成:改变氨基酸序列使得其含有一个或多个上述三肽序列(对N连接的糖基化位点而言)。也可以通过对原始抗体序列添加或取代为一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来制造改变(对O连接的糖基化位点而言)。

[0216] 也可以改变抗体的糖基化模式而不改变根本的(underlying)核苷酸序列。糖基化主要取决于用于表达抗体的宿主细胞。因为用于表达作为可能疗法的重组糖蛋白(例如抗体)的细胞类型很少是天然细胞,所以可以期望抗体糖基化模式中的变更(参阅例如Hse et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070)。

[0217] 除了对宿主细胞的选择以外,重组生产抗体期间影响糖基化的因素还包括:生长模式、培养基配方、培养密度、氧合作用、pH、纯化流程等等。已经提出多种方法用于改变在特定宿主生物中达到的糖基化模式,包括引入或过表达涉及寡糖生产的某些酶(U.S. 专利 Nos. 5,047,335; 5,510,261 和 5,278,299)。可以从糖蛋白上酶去除糖基化或某些类型的糖基化,例如使用内切糖苷酶H(Endo H)、N-糖苷酶F、内切糖苷酶F1、内切糖苷酶F2、内切糖苷酶F3来进行。另外,可以遗传工程改造重组的宿主细胞,使其在加工某些类型的多糖时缺陷。这些技术和类似的技术是本领域公知的。

[0218] 修饰的其它方法包括使用本领域已知的偶合技术,包括但不限于酶手段、氧化取代和螯合。可以使用修饰例如结合用于免疫测定的标签。经修饰的G1多肽使用本领域确定的步骤制造,并可以使用本领域已知的标准实验筛选,所述实验中的一些在下文和实施例中描述。

[0219] 在本发明的一些实施方案中,抗体包含经修饰的恒定区,如免疫惰性或部分惰性的恒定区,例如不引发补体介导的裂解、不刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),或不激活小胶质细胞;或在以下之任一个或多个中具有降低的活性(与未经修饰的抗体相比):引发补体介导的裂解、刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或激活小胶质细胞。恒定区的不同修饰可用于达到效应子作用的最佳水平和/或组合。参阅例如Morgan et al., *Immunology* 86:319-324(1995); Lund et al., *J. Immunology* 157:4963-9157:4963-

4969 (1996); Idusogie et al., J. Immunology 164:4178-4184 (2000); Tao et al., J. Immunology 143:2595-2601 (1989); 和 Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76 (1998)。在一些实施方案中, 恒定区如 Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; PCT 申请 No. PCT/GB99/01441; 和/或 UK 专利申请 No. 9809951.8 中所述被修饰。在其它实施方案中, 抗体包含含有以下突变的人重链 IgG2 恒定区: A330P331 到 S330S331 (氨基酸排序参考野生型 IgG2 序列)。Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624。还在其它实施方案中, 针对 N 连接的糖基化而言恒定区是不被糖基化的。在一些实施方案中, 通过将糖基化的氨基酸残基或侧翼残基 (其为恒定区中 N-糖基化识别序列的一部分) 突变, 使得针对 N 连接的糖基化而言恒定区不被糖基化。例如, N 糖基化位点 N297 可以被突变为 A、Q、K 或 H, 参阅 Tao et al., J. Immunology 143:2595-2601 (1989); 和 Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76 (1998)。在一些实施方案中, 针对 N 连接的糖基化而言, 恒定区不被糖基化。可通过酶 (例如通过酶 PNGase 去除碳水化合物) 或通过糖基化缺陷的宿主细胞中表达使得: 针对 N 连接的糖基化而言, 恒定区不被糖基化。

[0220] 其它抗体修饰包括如 1999 年 11 月 18 日公开的 PCT 公开 No. WO 99/58572 中所述被修饰的抗体。除针对靶分子的结合结构域外, 这些抗体包括具有下述氨基酸序列的效应子结构域, 所述氨基酸基本与人免疫球蛋白重链的所有或部分恒定结构域同源。这些抗体能够结合靶分子而不引发显著的补体依赖性裂解或细胞介导的靶标破坏。在一些实施方案中, 效应子结构域能够特异地结合 Fc γ Rn 和/或 Fc γ RIIb。这些典型地基于来自两个或更多人免疫球蛋白重链 C_H2 结构域的嵌合结构域。以该方式修饰的抗体特别适用于慢性抗体疗法, 以避免炎症和对常规抗体疗法的其它不良反应。

[0221] 本发明包括亲和力成熟的实施方案。例如, 可以通过本领域已知的步骤生产亲和力成熟的抗体 (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; 和 WO2004/058184)。

[0222] 可使用以下的方法来调节抗体的亲和力及表征 CDR。表征抗体 CDR 和/或改变 (例如促进) 多肽如抗体的亲合力的一种方法称作“文库扫描诱变”。通常, 文库扫描诱变如下作用。使用本领域认可的方法, 用两个或更多 (例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个) 氨基酸取代 CDR 中的一个或多个氨基酸位置。这产生了小的克隆文库 (在一些实施方案中, 每个分析的氨基酸位置一个文库), 每个克隆具有两个或更多成员的复杂性 (如果在每个位置取代两个或更多个氨基酸的话)。通常文库还包括包含天然 (未取代的) 氨基酸的克隆。筛选小量克隆例如约 20-80 个克隆 (取决于文库的复杂性) 对靶多肽 (或其它结合靶标) 的亲合力, 并鉴定具有提高的、同样的、降低的或无结合的候选者。用于测定亲合力的方法是本领域公知的。可以使用 Biacore 表面等离子共振分析测定亲合力, 该方法监测约 2 倍或更大的亲合力差异。当初始抗体已经以相对高的亲和力 (例如约 10mM 或更低的 K_d) 结合时, Biacore 特别适用。适用 Biacore 表面等离子共振的筛选描述于本文的实施例中。

[0223] 可以使用 Kinexa Biocensor、闪烁近似测定、ELISA、ORIGEN 免疫测定 (IGEN)、荧光淬灭、荧光转移和/或酵母展示来测定亲合力。也可以使用合适的生物测定筛选亲合力。

[0224] 在一些实施方案中,使用被认可的诱变方法(其中一些在本文中描述)用20个天然氨基酸取代(在一些实施方案中,每次一个)CDR中的每个氨基酸位置。这产生小的克隆文库(在一些实施方案中,每个分析的氨基酸位置一个文库),每个具有20个成员的复杂性(如果每个位置上取代了所有20个氨基酸的话)。

[0225] 在一些实施方案中,待筛选的文库在两个或更多位置中包含取代,所述位置其可以在相同的CDR或两个或更多的CDR中。因此,该文库可在一个CDR中的两个或更多的位置中包含取代。该文库可在两个或更多CDR的两个或更多位置中包含取代。文库可在3、4、5或更多位置中包含取代,所述位置存在于两个、三个、四个、五个或六个CDR中。可以使用低冗余密码子制备取代。参阅例如Balint et al., (1993) Gene 137 (1):109-18) 的表2。

[0226] CDR可以是CDRH3和/或CDRL3。CDR可以是CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2和/或CDRH3中的一个或多个。CDR可以是Kabat CDR、Chothia CDR、经扩展的CDR。

[0227] 可以对具有改进的结合的候选者进行测序,从而鉴定出导致改进的亲合力的CDR取代突变体(也称作“改进的”取代)。也可以对结合的候选者测序,从而鉴定保持结合的CDR取代。

[0228] 可以进行多轮筛选。例如,具有改进的结合的候选者(每个在一个或多个CDR的一个或多个位置上包含氨基酸取代)也适用于设计第二文库,所述第二文库至少在每个改进的CDR位置(即CDR中的氨基酸位置,该位置上的取代突变体显示改进的结合)上含有原始的和经取代的氨基酸。该文库的制备、筛选或选择在下文进一步讨论。

[0229] 文库扫描诱变也提供了用于表征CDR的手段,至于具有改进的结合、相同的结合、降低的结合或无结合的克隆的频率也提供了涉及每个氨基酸位置对于抗体-抗原复合物稳定性的重要性。例如,如果改变为所有20个氨基酸时CDR的位置维持结合,则该位置被鉴定为不太可能是抗原结合所需的位置。相反,如果CDR的一个位置仅在小部分取代时维持结合,则该位置被鉴定为对CDR功能重要的位置。因此,文库扫描诱变方法产生下述信息,所述信息涉及CDR中可以改变为许多不同氨基酸(包括所有20种氨基酸)的位置和CDR中不能被改变或仅能改变为少量氨基酸的位置。

[0230] 具有改进的亲合力的候选者可以组合于第二个文库中,所述文库包括改进的氨基酸、该位置上的原始氨基酸,并可进一步包括该位置上的其它取代,取决于所期望的或使用期望的筛选或选择方法所允许的文库的复杂性。另外,如果期望的话,可以将邻近的氨基酸位置随机化为至少两个或更多的氨基酸。邻近的氨基酸的随机化可以允许突变体CDR中额外的构象柔性,这可随后允许或便于引入更大量的改进型突变。该文库也包括在第一轮筛选中不显示改进的亲合力的位置上的取代。

[0231] 可以使用本领域已知的任何方法来筛选或选择第二个文库中具有改进的和/或改变的亲合力的文库成员,所述方法包括使用Biacore表面等离子共振分析筛选,和使用本领域已知用于选择的任何方法(包括噬菌体展示、酵母展示和核糖体展示)选择。

[0232] 本发明还包括融合肽,其包含来自本发明抗体(如G1)或多肽的一个或多个片段或区域。在一个实施方案中,提供包含SEQ ID NO:2(图5)中所示可变轻链区至少10个连续氨基酸和/或SEQ ID NO:1(图5)中所示可变重链区至少10个氨基酸的融合肽。在其它实施方案中,提供包含SEQ ID NO:2(图5)中所示可变轻链区的至少约10个、至少约15个、至少约20个、至少约25个、或至少约30个连续氨基酸和/或SEQ ID NO:1(图5)中所示可变重链区的至

少约10个、至少约15个、至少约20个、至少约25个或至少约30个连续氨基酸的融合多肽。在另一实施方案中,如图5的SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1所示,融合多肽包含G1轻链的可变区和/或重链可变区。在另一实施方案中,融合多肽包含G1的一个或多个CDR。还在其它实施方案中,融合多肽包含抗体G1的CDR H3和/或CDR L3。就本发明的目的而言,G1融合蛋白含有一个或多个G1抗体和另一氨基酸序列(例如异源序列或来自另一区域的同源序列),所述另一氨基酸序列在天然分子中不与所述G1抗体结合。示范性的异源序列包括,但不限于“标签”,例如FLAG标签或6His标签。标签是本领域公知的。

[0233] 可以通过本领域已知的方法(例如合成或重组地)创造G1融合多肽。典型地,通过使用本文所述重组方法制备编码它们的多核苷酸来制造本发明的G1融合蛋白,尽管也可以通过本领域已知的其它手段(包括例如化学合成)来制备。

[0234] 本发明还提供了包含来自G1的、与下述试剂缀合(例如连接)的抗体或多肽的组合物,所述试剂便于铜固体支持物(例如生物素或抗生物素蛋白)的偶合。简言之,通常提及G1或抗体时应激烈这些方法应用于本文所述的任何CGRP结合实施方案。缀合通常是指如本文所述将这些成分连接。可以以大量方法中的任何完成连接(其通常以至少用于施用的紧密结合将这些成分固定)。例如,当一种物质上具有能够与其它物质反应的亚基时,试剂和抗体之间可能直接反应。例如一种物质上的亲核基团(如氨基或巯基)可以能够与其它物质上的含羰基基团(例如酸酐或酸性卤化物)或含良好离去基团(例如卤化物)的烷基反应。

[0235] 本发明的抗体或多肽可以与与标签剂(或者称作“标签”)如荧光分子、放射性分子或本领域已知的任何其它标签连接。通常(直接或间接)提供信号的标签是本领域已知的。

[0236] 本发明还提供了下述组合物(包括药物组合物)和试剂盒,其包含抗体G1和(如本公开内容所明确的)本文公开的任何或所有抗体和/或多肽。

[0237] 本发明还提供了经分离的下述多核苷酸和包含所述多核苷酸的载体和宿主细胞,所述多核苷酸编码本发明的抗体和多肽(包括包含图5所示轻链和重链可变区的多肽序列的抗体)。

[0238] 因此,本发明提供了包含下述多核苷酸的多核苷酸(或组合物,包括药物组合物),所述多核苷酸编码以下任何:(a)表6所示抗体G1或其变体;(b)表6所示抗体G1或其变体的片段或区域;(c)表6所示抗体G1或其变体的轻链;(d)表6所示抗体G1或其变体的重链;(e)来自表6所示抗体G1或其变体轻链和/或重链的一个或多个可变区;(f)来自表6所示抗体G1或其变体的一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR);(g)来自抗体G1重链的CDR H3;(h)来自表6所示抗体G1或其变体轻链的CDR L3;(i)来自表6所示抗体G1或其变体轻链的三个CDR;(j)来自表6所示抗体G1或其变体重链的三个CDR;(k)来自表6所示抗体G1或其变体轻链的三个CDR和重链的三个CDR;和(l)包含从(b)到(k)中任一项的抗体。在一些实施方案中,多核苷酸包括SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示的一个或两个多核苷酸。

[0239] 另一方面,本发明提供了编码本文所述任何抗体(包括抗体片段)和多肽的多核苷酸,所述抗体和多肽例如具有受损的效应子作用的抗体和多肽。多核苷酸可以通过本领域已知的步骤制造。

[0240] 另一方面,本发明提供了包含本发明任何多核苷酸的组合物(例如药物组合物)。在一些实施方案中,所述组合物包含表达载体,所述表达载体包含编码本文所述G1抗体的多核苷酸。在其它实施方案中,该组合物包含表达载体,所述表达载体包含编码本文所述任

何抗体或多肽的多核苷酸。还在其它实施方案中,该组合物包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中所示的一种或两种多核苷酸。表达载体和多核苷酸组合物的施用在本文中进一步描述。

[0241] 另一方面,本发明提供了制造本文所述任何多核苷酸的方法。

[0242] 与任何这类序列互补的多核苷酸也包括在本发明内。多核苷酸可以是单链的(编码链或反义链)或双链的,并可以是DNA(基因组、cDNA或合成的)或RNA分子。RNA分子包括HnRNA分子(其含有内含子并以一对一的方式对应于DNA分子)和mRNA分子(其不含有内含子)。额外的编码或非编码序列可以(但不必须)存在于本发明的多核苷酸内,多核苷酸可以(但不必须)与其它分子和/或支持材料连接。

[0243] 多核苷酸可包含天然序列(即编码抗体或其部分的内源序列)或可包含这类序列的变体。多核苷酸变体含有一个或多个取代、添加、删除和/或插入,使得所编码的多肽的免疫反应性相对于天然的免疫反应性分子不被减小。对所编码的多肽免疫反应性的作用通常可以如本文所述评估。变体通常显示与编码天然抗体或其片段的多核苷酸序列至少约70%的同一性、更优选地至少约80%的同一性和最优选至少约99%的同一性。

[0244] 当如下文所述针对最大对应进行比对时,如果两个序列中核苷酸或氨基酸的序列是相同的,则称作这两种多核苷酸或多肽序列是“同一的”。典型地,通过将序列在比较窗口比较以鉴定和比较局部区域的序列相似性来进行两个序列之间的比较。本文使用“比较窗口”是指至少约20个连续位置(通常为30到约75个、40到约50个)的区段,其中在两个序列最适排列后可以将序列与参考序列的相同数量的连续位置进行比较。

[0245] 用于比较的序列的最适比对可以使用Lasergene生物信息学软件套装(DNASTAR, Inc., Madison, WI)软件中的Megalign程序,使用默认参数进行。该程序收录了以下参考文献中描述的若干比对流程: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 Phylogenesis 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, E.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。

[0246] 优选地,通过将两个最优排列的序列在至少20个位置的比较窗口上进行比较来测定“序列同一性百分比”,其中比较窗口中的那部分多核苷酸或多肽序列与用于两种序列最适比对的参考序列(其不包含添加或删除)相比可包含20%或更少、通常5%到15%或10%到12%的添加或删除(即缺口)。百分比如下计算:确定两序列中均存在同一核酸碱基或氨基酸残基的位置的数量得到匹配位置数量,用匹配位置数量除以参考序列中的位置总数(即窗口尺寸)并将结果乘以100,得到序列同一性百分比。

[0247] 变体也(或可选地)可以与天然基因或其补体的部分基本同源。这类多核苷酸变体

能够在中度严格的条件下与编码天然抗体的天然存在的DNA序列(或其互补序列)杂交。

[0248] 合适的“中度严格条件”包括在5X SSC, 0.5% SDS, 1.0mM EDTA (pH 8.0) 溶液中预洗涤; 在50℃-65℃, 5X SSC下过夜杂交; 然后在65℃下分别用含有0.1% SDS的2X、0.5X和0.2X SSC洗涤两次, 每次20分钟。

[0249] 本文使用的“高度严格条件”或“高严格度条件”是指: (1) 使用低离子强度和高温用于洗涤, 例如在50℃用0.015M氯化钠/0.0015M柠檬酸钠/0.1%十二烷基硫酸钠; (2) 在42℃杂交时使用变性剂如甲酰胺, 例如含有0.1%牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1%聚乙烯吡咯酮/50mM pH6.5的磷酸钠缓冲液, 和750mM氯化钠、75mM柠檬酸钠; 或(3) 在42℃使用50%甲酰胺, 5x SSC (0.75M NaCl、0.075M柠檬酸钠)、50mM磷酸钠 (pH 6.8)、0.1%焦磷酸钠、5x Denhardt's溶液、声处理的鲑精DNA (50μg/ml)、0.1% SDS和10%硫酸葡聚糖, 在42℃选于0.2x SSC (氯化钠/柠檬酸钠) 中和在55℃下于50%甲酰胺中洗涤, 然后是55℃下由含EDTA的0.1x SSC组成的高严格度洗涤。技术人员明白如何调节温度、离子强度等, 这是适应如探针长度等的因素所必需的。

[0250] 本领域的常规技术人员应当明白作为遗传密码子简并的结果, 存在编码本文所述多肽的许多核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些具有与任何天然基因核苷酸序列的最小同源性。但是, 由于密码子使用差异而改变的多核苷酸被本发明特别关注。另外, 包含本文提供的多核苷酸序列的基因的等位基因属于本发明的范围内。等位基因是由一个或多个突变(例如核苷酸的删除、添加和/或取代) 导致改变的内源基因。得到的mRNA和蛋白质可以(但不必须) 具有改变的结构或功能。可以使用标准技术(例如杂交、扩增和/或数据库序列比较) 鉴定等位基因。

[0251] 本发明的多核苷酸可以使用化学合成、重组方法或PCR获得。化学多核苷酸合成的方法是本领域公知的并不需要在本文详细描述。本领域技术人员可以使用本文提供的序列和商业的DNA合成仪生产期望的DNA序列。

[0252] 为了使用重组方法制备多核苷酸, 如本文所进一步讨论的, 可以将包含期望的序列的多核苷酸插入合适的载体中, 然后可以将载体引入合适的宿主细胞中用于复制和扩增。可以通过本领域已知的任何途径将多核苷酸插入宿主细胞中。通过引入(通过直接摄取、胞吞作用、转染、F交配或电穿孔) 外源多核苷酸转化细胞。外源多核苷酸被引入后可以作为未整合的载体(例如质粒) 或整合进宿主细胞基因组中来在细胞中维持。这样扩增的多核苷酸可以通过本领域公知的方法从宿主细胞中分离。参阅例如Sambrook et al. (1989)。

[0253] 或者, PCR允许再生产DNA序列。PCR技术是本领域公知的并描述于U.S. 专利Nos. 4, 683, 195, 4, 800, 159, 4, 754, 065和4, 683, 202, 以及PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauser Press, Boston (1994) 中。

[0254] 可以使用合适载体中经分离的DNA并将其插入合适的宿主细胞来获得RNA。当细胞复制和DNA被转录为RNA时, 可以随后使用本领域技术人员公知的方法将RNA分离, 例如如Sambrook et al., (1989) 中所公开。

[0255] 可以根据标准技术构建合适的克隆载体, 或从本领域可获得的大量克隆载体中选择。尽管所选择的克隆载体可根据要使用的宿主细胞而变化, 但是有用的载体通常会具有自我复制的能力、可具有特定限制性内切核酸酶的单个靶标, 和/或可带有用于标记物的基因, 所述标记物可用于选择含有该载体的克隆。合适的例子包括质粒和细菌病毒例如

pUC18、pUC19、Bluescript (例如pBS SK+) 及其衍生物mp18、mp19、pBR322、pMB9、CoIE1、pCR1、RP4, 噬菌体DNA和穿梭载体如pSA3和pAT28。存在可得自商业卖主如BioRad、Stratagene和Invitrogen的许多其它克隆载体。

[0256] 表达载体通常是含有本发明多核苷酸的可复制的多核苷酸构建体。这意味着表达载体必须在宿主细胞中可以作为附加体或作为染色体DNA的整合部分复制。合适的表达载体包括但不限于质粒、病毒(包括腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒)载体、粘粒和PCT公开No.WO 87/04462中公开的表达载体。载体组件通常包括,但不限于以下的一种或多种:单个序列;复制起点;一个或多个标记物基因;合适的转录调控元件(例如启动子、增强子和终止子)。对于表达(即翻译)而言,通常也需要一种或多种翻译调控元件,例如核糖体结合位点、翻译起始位点和终止密码子。

[0257] 含有感兴趣的多核苷酸的载体可以通过大量合适手段中的任何被引入宿主细胞中,所述手段包括电穿孔,使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其它物质的转染;微粒轰击;脂质转染;和感染(例如其中载体是感染剂如痘苗病毒)。引入载体或多核苷酸的选择通常取决于宿主细胞的特征。

[0258] 本发明还提供了包含本文公开的任何多核苷酸的宿主细胞。任何能够过表达异源DNA的宿主细胞可以用于分离下述基因的目的,所述基因编码感兴趣的抗体、多肽或蛋白质。哺乳动物宿主细胞非限制性的例子包括,但不限于COS、HeLa和CHO细胞。还参阅PCT公开No.WO 87/04462。合适的非哺乳动物宿主细胞包括原核生物(例如大肠杆菌或*B.subtillis*)和酵母(例如*S.cerevisiae*,*S.pombe*;或*K.lactis*)。优选地,如果宿主细胞中存在相应的感兴趣的内源抗体或蛋白质,宿主细胞以比其高约5倍的水平、更优选高约10倍、甚至更优选高20倍的水平表达cDNA。筛选与AD 1-40特异结合的宿主细胞通过免疫测定或FACS进行。可以鉴定过表达感兴趣的抗体或蛋白质的细胞。

[0259] D.组合物

[0260] 本发明方法中使用的组合物包含有效量的本文所述的抗CGRP拮抗剂抗体或抗CGRP拮抗剂抗体衍生的多肽。这类组合物的例子以及如何配制的方法也描述于先前的章节和下文中。在一个实施方案中,组合物还包含CGRP拮抗剂。在另一实施方案中,组合物包含一种或多种抗CGRP拮抗剂抗体。在其它实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体识别人CGRP。还在其它实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体被人源化。还在其它实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体包含下述恒定区,所述恒定区不引发不想要的或不期望的免疫应答,如抗体介导的裂解或ADCC。在其它实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体包含抗体G1的一个或多个CDR(例如一个、两个、三个、四个、五个或在一些实施方案中所有六个来自G1的CDR)。在一些实施方案中,抗CGRP拮抗剂抗体是人的。

[0261] 应当理解:组合物可包含多于一种抗CGRP拮抗剂抗体(例如识别CGRP不同表位的抗CGRP拮抗剂抗体的混合物)。其它的示范性组合物包含多于一种识别相同表位的抗CGRP拮抗剂抗体,或与CGRP的不同表位结合的不同种类的抗CGRP拮抗剂抗体。

[0262] 本发明中使用的组合物可进一步包含低压冻干配方或水性溶液形式的可药用的运载体、赋形剂或稳定剂(Remington:The Science and practice of Pharmacy 20th Ed.(2000)Lippincott Williams and Wilkins,Ed.K.E.Hoover)。可接受的运载体、赋形剂或稳定剂在剂量和浓度上对受体是无毒的,并可包含缓冲液如磷酸、柠檬酸或其它有机酸;抗

氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化六甲双铵;氯化苄甲烃铵、氯化苄乙铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和m-甲酚);低分子量(少于约10个残基)的多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水多聚体如聚乙烯吡咯酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐的反例子如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非例子型表面活性剂,如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。可药用的赋形剂在本文进一步描述。

[0263] 抗CGRP拮抗剂抗体及其组合物也可以与其它试剂组合使用,所述其它试剂起到增强和/或补充试剂有效性的作用。

[0264] E. 试剂盒

[0265] 本发明还提供了快速方法中使用的试剂盒。本发明的试剂盒包括一个或多个包含本文所述抗CGRP拮抗剂抗体(例如人源化的抗体)或多肽的容器,和根据本文所述的任何本发明方法使用的说明书。通常,这些说明书包括根据本文所述的任何方法,施用抗CGRP拮抗剂抗体以治疗、改善或预防头痛(例如偏头痛)的描述。该试剂盒还包括选择适合治疗的个体的描述,所述选择基于鉴定个体是否具有头痛或个体是否处于头痛的风险下。还在其它实施方案中,该说明书包括对处于头痛(例如偏头痛)风险下的个体施用抗CGRP拮抗剂抗体的描述。

[0266] 在一些实施方案中,抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,抗体是人。在其它实施方案中,抗体是单克隆抗体。还在其它实施方案中,抗体包含抗体G1的一个或多个CDR(例如一个、两个、三个、四个、五个,或在一些实施方案中来自G1的所有六个CDR)。

[0267] 涉及抗CGRP拮抗剂抗体使用的说明书通常包括如用于计划治疗的剂量、给药时间表和施用途径的信息。容器可以是单位剂量、大量包装(例如多剂量包装)或亚单位剂量。本发明的试剂盒中提供的说明书典型地是标签或包装内页(例如包括在试剂盒中的纸片)上的书面说明书,但是也可以是可机读的说明书(例如磁性或光学存储盘上承载的说明书)。

[0268] 标签或包装内页指出组合物用于治疗、改善和/或预防头痛(例如偏头痛)。可以提供用于实践本文所述任何方法的说明书。

[0269] 本发明的试剂盒在合适的包装中。合适的包装包括但不限于:管、瓶、广口瓶、柔软包装(例如密封的Mylar或塑料袋)等。还注意到的是用于同特定器具组合施用的包装,所述特定器具例如吸入器、鼻施用器具(例如喷雾器)或融合器具如迷你泵。试剂盒可具有无菌接入口(例如容器可以是带有可被皮下注射针穿透的塞子的静脉注射溶液袋或瓶)。容器也可以具有无菌接入口(例如容器可以是带有可被皮下注射针穿透的塞子的静脉注射溶液袋或瓶)。组合物中至少一种活性剂是抗CGRP拮抗剂抗体。容器还可包含第二种药物活性剂。

[0270] 试剂盒可任选的提供其它成分如缓冲液和说明信息。通常,试剂盒含有容器和容器上或与容器结合的标签或包装内页。

[0271] 提供以下的实施例用于阐述而非限制本发明。

实施例

[0272] 实施例1:针对CGRP的单克隆抗体的产生和表征

[0273] 产生抗CGRP抗体。为了产生对大鼠和人CGRP具有跨物种反应性的抗CGRP抗体,以不同的间隔用佐剂(每只足垫50 μ l,每只小鼠100 μ l)中与KLH缀合的25–100 μ g人 α -CGRP或 β -CGRP免疫小鼠。免疫通常如Geerligs HJ et al.,1989,J.Immunol.Methods 124:95–102; Kenney JS et al.,1989,J.Immunol.Methods 121:157–166;和Wicher K et al.,1989,Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.89:128–135中所述进行。首先用CFA(完全弗氏佐剂)中与KLH缀合的50 μ g人 α -CGRP或 β -CGRP免疫小鼠。21天后用IFA(不完全弗氏佐剂)中与KLH缀合的25 μ g人 β -CGRP(对于首先用人 α -CGRP免疫的小鼠而言)或 α -CGRP(对于首先用人 β -CGRP免疫的小鼠而言)第二次免疫小鼠。第二次免疫后二十三天用IFA中与KLH缀合的25 μ g大鼠 α -CGRP进行第三次免疫。十天后,使用ELISA检验抗体效价。第三次免疫后34天用IFA中25 μ g肽(大鼠 α -CGRP-KLH)进行第四次免疫。第四次免疫后32天用100 μ g溶解肽(大鼠 α -CGRP)进行最后的强化。

[0274] 从被免疫小鼠获得脾细胞并与NS0骨髓瘤细胞以10:1的比例用聚乙二醇1500融合。将杂种96孔板中含有20%马血清和2-草酰乙酸盐/丙酮酸盐/胰岛素(Sigma)的DMEM中,并开始次黄嘌呤/氨基蝶呤/胸腺嘧啶选择。在第8天向所有孔中添加含有20%马血清的100 μ l DMEM。通过使用抗体捕获免疫测定法筛选杂种的上清液。对抗体种类的确定用种类特异的第二抗体来进行。

[0275] 根据它们与人和大鼠CGRP的结合性,选出一组生产单克隆抗体的细胞系,以进一步分析。这些抗体和特征显示在下文表2和表3中。

[0276] 纯化和Fab片段制备。使用蛋白A亲和层析从杂交瘤培养物的上清液中纯化选用来进一步分析的单克隆抗体。将上清液平衡至pH 8。然后将上清液上样在用PBS平衡至pH 8的蛋白A柱MabSelect(Amersham Biosciences#17-5199-02)上。用5倍体积的PBS,pH 8洗涤柱。用50mM柠檬酸-磷酸缓冲液,pH 3洗脱抗体。用1M磷酸缓冲液,pH 8中和洗脱的抗体。用PBS,pH 7.4透析经纯化的抗体。通过SDS-PAGE使用鼠单克隆抗体标准曲线测定抗体浓度。

[0277] 使用Immunopure Fab试剂盒(Pierce#44885)通过全抗体的木瓜蛋白酶解制备Fab并依照制造商的说明书通过流经蛋白A色谱纯化。通过ELISA和/或SDS-PAGE电泳使用已知浓度的标准Fab(通过氨基酸分析测定),和通过A280使用10D=0.6mg/ml(或基于氨基酸序列的理论当量)测定浓度。

[0278] Fab的亲合力测定。抗CGRP单克隆抗体的亲合力在25 $^{\circ}$ C或37 $^{\circ}$ C下使用Biacore3000TM表面等离子共振(SPR)体系(Biacore,INC,Piscataway NJ)与制造商自己的电泳缓冲液HBS-EP(10mM HEPES pH 7.4、150mMNaCl、3mM EDTA、0.005%v/v polysorbate P20)测定。通过由SA芯片上预先固定的链霉亲和素捕获N端生物素化的CGRP肽(来自GenScript Corporation,New Jersey或Global Peptide Services,Colorado的定制产品)并测量越过CGRP表面滴定的抗体Fab的结合动力学来测定亲合力。生物素化的CGRP被稀释进HBS-EP中并以少于0.001mg/ml的浓度注射在芯片上。使用越过个体芯片通道的不同流动时间,达到了两种抗体密度范围:用于详细动力学研究的<50个响应单位(RU)和用于浓度研究和筛选的约800个RU。将典型地跨越1 μ M–0.1nM(针对0.1–10x估计的K_D)浓度的经纯化的Fab片段的两倍或三倍连续稀释以100 μ L/分钟注射并允许10分钟的解离时间。每个结合循环后,用25%v/v乙醇中25mM NaOH再生表面,所述表面可耐受数百个循环。通过使用BIAevaluation程序将数据与Langmuir结合模型(Karlsson,R.Roos,H.Fagerstam,

L.Petersson,B.(1994).Methods Enzymology 6.99-110) 拟合同时获得动力学结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。从比例 $KD=k_{off}/k_{on}$ 计算整体平衡解离常数(KD)。鼠Fab片段的亲和力和在表2和表3中显示。

[0279] 鼠抗CGRP抗体的表位作图。为了测定抗CGRP抗体结合在人 α -CGRP上的表位,如上所述通过在SA感受芯片上捕获N端生物素化的CGRP片段氨基酸19-37和氨基酸25-37测量Fab片段对多种CGRP片段的亲合力。图1显示在25℃测量的它们的亲合力。如图1所示,除抗体4901外的任何抗体,以它们对全长人 α -CGRP(1-37)的亲合力相似的亲和力与人 α -CGRP片段19-37和25-37结合。抗体4901以比结合全长人 α -CGRP片段低六倍的亲和力结合人 α -CGRP片段25-37,主要因为脱离速率的丧失。数据指出抗CGRP抗体通常与CGRP的C末端结合。

[0280] 进行丙氨酸扫描,来进一步表征人 α -CGRP中涉及抗CGRP抗体结合的氨基酸。通过肽合成产生带有单个丙氨酸取代的不同的人 α -CGRP变体。它们的氨基酸序列与Biacore分析中使用的所有其它肽一起显示于表4中。如上所述使用Biacore测定抗CGRP抗体的Fab片段对这些变体的亲和力。如图1中所示,所有12中抗体靶向C末端的表位,氨基酸F37是最重要的残基。F37突变为丙氨酸显著地降低了抗CGRP抗体对肽的亲和力或甚至完全封闭了抗CGRP抗体对肽的结合。另一最重要的氨基酸残基为G33,然而,仅高亲和力抗体(7E9、8B6、10A8和7D11)受该位置上丙氨酸取代的影响。氨基酸残基S34也在这四种高亲和力抗体的结合中起到显著的、但是较小的作用。

[0281] 表2.抗CGRP单克隆抗体结合人 α -CGRP的特征及其拮抗剂活性

[0282]

抗体	25℃下 对人 α - CGRP的 K_D (nM)	37℃下 对人 α - CGRP的 K_D (nM)	25℃下以细胞 为基础的人 α - CGRP与其受体 结合的封闭 (通过cAMP 活化测量)	在放射性配体 结合实验中测量 的25℃(室温) 下的 IC_{50} (nm) 结合位点
7E9	1.0	0.9	Yes	2.5
8B6	1.1	1.2	Yes	4.0
10A8	2.1	3.0	Yes	n.d.
7D11	4.4	5.4	Yes	n.d.
6H2	9.3	42	Yes	12.9
4901	61	139	Yes	58
14E10	80	179	Yes	n.d.
9B8	85	183	No	n.d.
13C2	94	379	No	n.d.
14A9	148	581	No	n.d.
6D5	210	647	No	n.d.
1C5	296	652	No	n.d.

[0283] 注意:抗体4901可商业获得(Sigma,产品No.C7113)。

[0284] n.d.=未测定

[0285] 表3.抗CGRP单克隆抗体结合大鼠 α -CGRP的特征和拮抗剂活性

[0286]

抗体	37℃下对大鼠 α -CGRP的 K_D (nM)	25℃下以细胞为 基础的大鼠 α -CGRP与其受体 结合的封闭(通过 cAMP活化测量)	在隐静脉神经 实验中的 体内封闭
4901	3.4	是	是
7E9	47	是	是
6H2	54	否	否
8B6	75	是	是
7D11	218	是	是
10A8	451	否	n.d.
9B8	876	否	n.d.
14E10	922	否	n.d.
13C2	> 1000	否	n.d.
14A9	> 1000	否	n.d.
6D5	> 1000	否	n.d.
1C5	> 1000	否	n.d.

[0287] "n.d"表示对该抗体未进行测试。

[0288] 表4. 人 α -CGRP片段(SEQ ID NOS:15-40)和相关肽(SEQ ID NOS:41-47)的氨基酸序列。除SEQ ID NOS:36-40外所有的肽被C末端酰胺化。黑体的残基表示点突变。

CGRP	氨基酸序列	SEQ ID NO
1-37 (WT)	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVKNNFVPTNVGSKAF	15
8-37	VTHRLAGLLSRSGGVKNNFVPTNVGSKAF	16

[0289]

CGRP	氨基酸序列	SEQ ID NO
19-37	SGGVKNNFVPTNVGSKAF	17
P29A (19-37)	SGGVKNNFVATNVGSKAF	18
K35A (19-37)	SGGVKNNFVPTNVGSAAF	19
K35E (19-37)	SGGVKNNFVPTNVGSEAF	20
K35M (19-37)	SGGVKNNFVPTNVGSMFAF	21
K35Q (19-37)	SGGVKNNFVPTNVGSQAF	22
F37A (19-37)	SGGVKNNFVPTNVGSKAA	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	SGGVKNNFVPTNVGSKAF	36
19-36-COOH	SGGVKNNFVPTNVGSKA	37
1-36-COOH	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVKNNFVPTNVGSKA	38
1-19-COOH	ACDTATCVTHRLAGLLSR	39
1-13-COOH	ACDTATCVTHRLA	40
大鼠 α (1-37)	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKDNFVPTNVGSEAF	41
大鼠 α (19-37)	SGGVKDNFVPTNVGSEAF	42
人 β (1-37)	ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKSNNFVPTNVGSKAF	43
大鼠 β (1-37)	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKDNFVPTNVGSKAF	44
人降钙素 (1-32)	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	45
人淀粉不溶素(1- 37)	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	46
人肾上腺髓质素(1- 52)	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDK DKDNVAPRSKISPQGY	47

[0290] 实施例2:使用体外实验筛选抗CGRP拮抗剂抗体

[0291] 使用基于细胞的cAMP活化实验和结合实验,对鼠抗CGRP抗体在体外针对拮抗剂活

性进行进一步筛选。

[0292] 通过cAMP实验测量拮抗剂活性。在存在或不存在抗CGRP抗体(终浓度1-3000nM)或大鼠 α -CGRP或人 α -CGRP(终浓度0.1nM-10 μ M;作为c-AMP活化的阳性对照)时,将五微升人或大鼠 α -CGRP(终浓度50nM)分散在384-孔平板(Nunc,Cat.No.264657)中。向平板的孔中添加十微升刺激缓冲液(如果使用人 α -CGRP则为人SK-N-MC,如果使用大鼠 α -CGRP则为来自ATCC的大鼠L6)中的细胞(20mM HEPES,pH 7.4、146mM NaCl、5mM KCl、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂和500 μ M 3-异丙基-1-甲基黄嘌呤(IBMx))。将平板在室温孵育30分钟。

[0293] 孵育后,使用HitHunter™酶片段互补实验(Applied Biosystems)依照制造商的说明书进行cAMP活化。该实验以经遗传工程操作的 β -半乳糖苷酶为基础,所述酶由称作酶受体(EA)和酶供体(ED)的两个片段组成。当这两个片段被分离时,酶失活。当片段在一起时,它们能够通过称作互补的过程自发地重组形成活性酶。EFC测试平台使用ED-cAMP肽缀合物,其中cAMP被抗cAMP识别。该ED片段能够与EA再结合形成活性酶。在该测定中,抗cAMP抗体被最优地滴定以结合ED-cAMP缀合物和抑制酶形式。细胞裂解物样品中的cAMP水平与ED-cAMP缀合物竞争结合抗cAMP抗体。测定中游离的ED量与cAMP的浓度成比例。因此,通过活性酶的形成测量cAMP,所述活性酶的形成通过 β -半乳糖苷酶发光底物的反转定量。通过添加10 μ l裂解缓冲液和抗cAMP抗体(1:1比例),然后在室温下孵育60分钟进行cAMP活化实验。然后向每孔中添加10 μ l ED-cAMP试剂并在室温下孵育60分钟。孵育后向每孔中添加20 μ l EA试剂和CL混合物(含有底物)(1:1比例)并在室温下孵育1-3小时或过夜。在PMT器具上以1秒/孔或在图像仪上以30秒/板对平板读数。通过 α -CGRP抑制cAMP活化的抗体在上表2和表3中鉴定(称作“是”)。表2和3中的数据指示测定中被证明有拮抗剂活性的抗体通常具有高的亲和力。例如,对人 α -CGRP具有约80nM或更少的K_D(在25℃下测定)或对大鼠 α -CGRP具有约47nM或更少的K_D(在37℃下测定)的抗体在该测定中显示拮抗剂活性。

[0294] 放射性配体结合测定。如前所述进行结合测定以测量抗CGRP抗体在封闭CGRP结合受体中的IC₅₀。Zimmermann et al.,Peptides 16:421-4,1995;Mallee et al.,J.Biol.Chem.277:14294-8,2002。将来自SK-N-MC细胞中的膜(25 μ g)在总体积为1mL的含有10pM¹²⁵I-人 α -CGRP孵育缓冲液(50mM Tris-HCL,pH 7.4,5mM MgCl₂,0.1%BSA)中于室温下孵育90分钟。为了测定抑制浓度(IC₅₀),将来自约100倍的更高浓度的储存溶液的抗体或未标记的CGRP(作为对照)在孵育缓冲液中溶解为不同的浓度,并与膜和10pM¹²⁵I-人 α -CGRP孵育相同的时间。通过滤过被0.5%polyethylenimine封闭的玻璃微纤维(GF/B,1 μ m)终止孵育。绘制剂量应答曲线并通过使用等式 $KI = IC_{50} / (1 + ([配体] / K_D))$ 测定K_I值;其中对于人 α -CGRP对存在于SK-N-MC细胞中的CGRP1受体而言,平衡解离常数K_D=8pM,B_{max}=0.025pmol/mg蛋白质。报导的IC₅₀值(依照IgG分子)被转化为结合位点(乘以2),从而其能够与通过Biacore测定的亲和力(K_D)比较(见表2)。

[0295] 表2显示了鼠抗体7E9、8B6、6H2和4901的IC₅₀值。数据指示抗体亲和力通常对应于IC₅₀:具有更高亲和力(更低K_D值)的抗体在放射性配体结合测定中具有更低的IC₅₀。

[0296] 实施例3:抗CGRP拮抗剂抗体对大鼠隐神经刺激诱导的皮肤血管扩张的作用

[0297] 为了测试抗CGRP抗体的拮抗剂活性,使用先前描述的大鼠模型测试抗体对大鼠隐神经刺激引起的皮肤血管扩张的作用。Escott et al.,Br.J.Pharmacol.110:772-776,1993。在该大鼠模型中,隐神经电刺激诱导从神经末梢释放CGRP,导致皮肤血流增加。在隐

神经刺激后测量雄性Sprague Dawley大鼠(170–300g,来自Charles River Hollister)足部皮肤中的血流。用2%异氟烷将大鼠维持麻醉。在实验开始时给予溴苄铵(30mg/kg,静脉施用)以最小化隐神经的交感神经纤维伴随刺激引起的血管收缩。通过使用与温度受控的加热毯连接的直肠探头将体温维持在37℃。除了图3所示的实验将测试化合物和对照通过尾静脉注射外,通过右股静脉将包括抗体、阳性对照(CGRP 8-37)和媒介(PBS,0.01%吐温20)的化合物静脉给予,对图2A和2B所示实验而言,腹膜内(IP)注射抗体4901和7D11。由于阳性对照化合物CGRP 8-37(血管扩张拮抗剂)的段半衰期,其在神经刺激前3–5分钟以400nmol/kg(200μl)给予。Tan et al.,Clin.Sci.89:656–73,1995。抗体以不同的剂量给予(1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg和25mg/kg)。

[0298] 对图2A和2B所示实验而言,在电脉冲刺激前72小时腹膜内(IP)施用抗体4901(25mg/kg)、抗体7D11(25mg/kg)或媒介对照(含0.01%吐温20的PBS)。对图3所示实验而言,在电脉冲刺激前24小时静脉施用抗体4901(1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg或25mg/kg)或媒介对照(含0.01%吐温20的PBS)。施用抗体或媒介对照后,手术暴露右后肢的隐神经,最接近地切割并用塑料膜覆盖以防干燥。将激光多普勒探头置于后爪皮肤的背中部侧上,其为隐神经支配的区域。用激光多普勒流量计监测皮肤血流(测量为血细胞通量)。当稳定的基线通量(少于5%的变化)被建立至少5分钟时,将神经置于铂双极电极上并用电刺激(2Hz,10V,1ms,持续30秒)60个脉冲,20分钟后再次刺激。对于应答电脉冲刺激的每个通量而言,通过通量-时间曲线下的面积(AUC,其等于通量的改变乘以时间的改变)评价皮肤血流的累积变化。计算应答这两次刺激的血流的平均值。将动物在一到三小时的时间段中保持麻醉。

[0299] 如图2A和2B中所示,与对照相比,通过在隐神经上施用电脉冲刺激的血流增加被CGRP 8-37(400nmol/kg,静脉施用)、抗体4901(25mg/kg,腹膜内施用)或抗体7D11(25mg/kg,腹膜内施用)的存在抑制。CGRP 8-37在隐神经刺激前3–5分钟施用;抗体在隐神经刺激前72小时施用。如图3所示,通过在隐神经上应用电脉冲刺激的血流增加被抗体4901的存在抑制,所述抗体在隐神经刺激前24小时以不同剂量(1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg和25mg/kg)静脉施用。

[0300] 对于图4A和4B中所示实验而言,在抗体施用前手术暴露隐神经。手术暴露右后肢的隐神经,最接近地切割并用塑料膜覆盖以防干燥。将激光多普勒探头置于后爪皮肤的背中部上,其为隐神经支配的区域。用激光多普勒流量计监测皮肤血流(测量为血细胞通量)。在注射溴苄铵后三十到四十五分钟,稳定的基线通量(少于5%的变化)被建立至少5分钟时,将神经置于铂双极电极上并用电刺激(2Hz,10V,1ms,持续30秒),20分钟后再次刺激。使用应答这两次刺激的血流通量的平均值建立对电刺激的基线应答(时间0)。然后静脉(i.v.)施用抗体4901(1mg/kg或10mg/kg)、抗体7E9(10mg/kg)、抗体8B6(10mg/kg)或媒介(含0.01%吐温20的PBS)。随后,在抗体或媒介施用后30分钟、60分钟、90分钟和120分钟刺激(2Hz,10V,1ms,持续30秒)神经。在大约三小时的时间段中保持动物麻醉。对于应答电脉冲刺激的每个通量而言,通过通量-时间曲线下的面积(AUC,其等于通量的改变乘以时间的改变)评价皮肤血流的累积变化。

[0301] 如图4A中所示,当在抗体施用后60分钟、90分钟和120分钟应用电刺激时,通过在隐神经上应用电脉冲刺激的血流增加被静脉施用的1mg/kg的抗体4901的存在显著抑制;当在抗体施用后30分钟、60分钟90分钟和120分钟应用电刺激时,通过在隐神经上应用电脉冲

刺激的血流增加被静脉施用的10mg/kg的抗体4901的存在显著抑制。图4B显示当在抗体施用后30分钟、60分钟、90分钟和120分钟应用电脉冲刺激时,通过在隐神经上应用电脉冲刺激的血流增加被抗体7E9 (10mg/kg,静脉施用)的存在显著抑制;当在抗体施用后30分钟应用电脉冲刺激时,被抗体8B6 (10mg/kg,静脉施用)的存在显著抑制。

[0302] 这些数据表明,如通过刺激大鼠隐神经诱导的皮肤血管扩张所测量的,抗体4901、7E9、7D11和8B6在封闭CGRP活性中是有效的。

[0303] 实施例4:对抗CGRP抗体G1及其变体的表征

[0304] 抗CGRP抗体G1重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列在图5中显示。使用以下的方法表达和表征抗体G1及其抗体。

[0305] 使用的表达载体。抗体Fab片段的表达位于与Barbas (2001) Phage display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press pg 2.10. Vector pComb3X中所述相似的IPTG诱导型启动子lacZ的控制下,然而,修饰包括以下的额外结构域的添加和表达:人 κ 轻链恒定结构域和IgG2人免疫球蛋白的CH1恒定结构域、Ig γ -2链C区、蛋白质编号P01859;免疫球蛋白 κ 轻链(人),蛋白质编号CAA09181。

[0306] 小规模Fab制备。从用Fab文库转化(使用电穿孔感受态TG1细胞或化学感受态Top 10细胞)的大肠杆菌(E. coli)中,使用单个克隆接种母板(琼脂LB+羧苄西林(50ug/mL)+2%葡萄糖)和工作板(2mL/孔,96孔/板),其中每个孔含有1.5mL LB+羧苄西林(50ug/mL)+2%葡萄糖。对平板使用透气的粘合封条(ABgene, Surrey, UK)。将每个平板在30℃孵育12-16小时;剧烈摇动工作板。将母板储存于4℃直到需要,而将来自工作板的细胞离心(400rpm, 4℃, 20分钟)并重悬于1.0mL LB+羧苄西林(50ug/mL)+0.5mM IPTG中,通过在30℃剧烈摇动5小时诱导Fab的表达。将经诱导的细胞在4000rpm, 4℃离心20分钟并重悬于0.6mL Biacore HB-SEP缓冲液(10mM Hepes pH 7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.005% v/v P20)中。通过冰冻(-80℃)然后在37℃融化完成经HB-SEP悬浮的细胞的裂解。将细胞裂解液在4000rpm, 4℃离心1小时,将碎片与含Fab的上清液分离,随后使用Millipore Multiscreen Assay System 96-孔滤板和真空多头管(vacuum manifold)过滤(0.2 μ m)上清液。通过将经过滤的上清液越过感受芯片上的CGRP注射,使用Biacore对其进行分析。从母板上复苏表达Fab的亲力和选择性克隆,所述克隆提供了用于PCR、测序和质粒制备的模板DNA。

[0307] 大规模Fab制备。为了获得动力学参数,如下大规模表达Fab。用1mL“初始”过夜培养物接种含有150mL LB+羧苄西林(50ug/mL)+2%葡萄糖的锥形瓶,所述培养物来自亲和力选择的表达Fab的大肠杆菌克隆。使用初始培养物的剩余部分(~3mL)制备质粒DNA(QIAprep mini-prep, Qiagen试剂盒)用于测序和进一步加工。将大的培养物在30℃剧烈摇动培养直到达到1.0的OD_{600nm}(典型地用12-16小时)。通过在4000rpm, 4℃离心20分钟沉淀细胞,并重悬于150mL LB+羧苄西林(50ug/mL)+0.5mM IPTG中。在30℃表达5小时后,通过在4000rpm, 4℃离心20分钟沉淀细胞、悬浮于10mL Biacore HBS-EP缓冲液中,并使用单个冻(-80℃)/融(37℃)循环裂解。通过在4000rpm, 4℃离心1小时沉淀细胞裂解物,将上清液收集并过滤(0.2 μ m)。将经过滤的上清液上样在用PBS, pH8平衡的Ni-NTA uperflow sepharose (Qiagen, Valencia, CA)柱上,然后用5倍体积的PBS, pH 8洗涤。个体Fab用PBS (pH 8)+300mM咪唑洗脱在不同的级分中。将含Fab的级分合并并在PBS中透析,然后在亲和力表征之前通过ELISA定量。

[0308] 完整抗体制备。为了表达完整的抗体,将重链和轻链可变区克隆进哺乳动物表达载体中并使用lipofectamine转染进HEK 293细胞中用于瞬时表达。使用蛋白A用标准方法纯化抗体。

[0309] 载体pDb.CGRP.hFcGI是包含G1抗体重链的表达载体,并适用于重链的瞬时或稳定表达。载体pDb.CGRP.hFcGI具有对应于以下区域的核苷酸序列:鼠巨细胞病毒启动子区(核苷酸7-613);合成的内含子(核苷酸613-1679);DHFR编码区(核苷酸688-1253);人生长激素信号肽(核苷酸1899-1976);G1的重链可变区(核苷酸1977-2621);含有以下突变的人重链IgG2恒定区:A330P331到S330S331(氨基酸编码参考野生型IgG2序列;参阅Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624)。载体pDb.CGRP.hFcGI在2005年七月十五日保藏于ATCC,并被命名为ATCC编号No.PTA-6867。

[0310] 载体pEb.CGRP.hKGI是包含G1抗体轻链的载体,并适用于轻链的瞬时表达。载体pEb.CGRP.hKGI具有对应于以下区域的核苷酸序列:鼠巨细胞病毒启动子区(核苷酸2-613);人EF-1内含子(核苷酸614-1149);人生长激素信号肽(核苷酸1160-1237);抗体G1轻链可变区(核苷酸1238-1558);人 κ 链恒定区(核苷酸1559-1882)。载体pEb.CGRP.hKGI在2005年七月十五日保藏于并被命名为ATCC编号No.PTA-6866。

[0311] 用于亲和力测定的Biacore测定。G1单克隆抗体及其变体的亲和力在25℃或37℃下使用Biacore3000™表面等离子共振(SPR)体系(Biacore, INC, Piscataway NJ)测定。通过由预先固定的链霉亲和素(SA感受芯片)捕获N端生物素化的CGRP肽或片段并测量越过芯片上的CGRP或片段滴定的抗体G1Fab片段或变体的结合动力学来测定亲和力。所有的Biacore测定在HBS-EP电泳缓冲液(10mM HEPES pH 7.4、150mM NaCl、3mMEDTA、0.005% v/v polysorbate P20)中进行。通过将N生物素化的CGRP在HBS-EP缓冲液中稀释为少于0.001mg/ml的浓度并使用多种接触时间将越过SA感受芯片注射来制备CGRP表面。对应于<50个响应单位(RU)捕获水平的低容量表面用于高分辨率动力学研究,而高容量表面(约800个RU的捕获的CGRP)用于浓度研究、筛选和溶液亲和力测定。通过将抗体G1Fab连续地稀释两倍或三倍增量至跨越1 μ M-0.1nM(针对0.1-10x估计的 K_D)的浓度获得动力学数据。典型地,将样品以100 μ L/分钟注射1分钟并允许至少10分钟的解离时间。每个结合循环后,用25% v/v乙醇中25mM NaOH再生表面,所述表面可耐受数百个循环。通过使用BIAevaluation程序将整个滴定系列(典型地一式两份产生)与Langmuir结合模型整体拟合。这获得了针对每个结合相互作用的一对独特的结合和解离动力学速率常数(分别为 k_{on} 和 k_{off}),其比例给出平衡解离常数($K_D = k_{off}/k_{on}$)。以该方式测定的亲和力(K_D 值)列在表6和7中。

[0312] 对具有极端低解离速率(offrates)的结合相互作用的高分辨率分析。对于具有极端低解离速率的相互作用(特别是25℃下抗体G1Fab与芯片上人 α -CGRP的结合)而言,在两部分实验中获得亲和力。使用具有以下修饰的上述方案。通过将跨越550nM-1nM的2-倍效价系列(一式两份)以100 μ L/分钟注射30秒和仅允许30秒的解离阶段来测定结合速率常数(k_{on})。通过将相同效价系列的三种浓度(高、中和低)一式两份注射30秒并允许2小时的解离阶段来测定解离速率常数(k_{off})。通过将两种类型实验中获得和值组合获得每种相互作用的亲和力(K_D),如表5所示。

[0313] 通过Biacore测定溶液亲和力。通过Biacore在37℃下测量抗体G1对大鼠 α -CGRP和F37A (19-37)人D-CGRP的溶液亲和力。使用高容量CGRP芯片表面(选择高亲和力人 α -CGRP

用于检测目的)并且HBS-EP电泳缓冲液以5 μ L/分钟流动。将恒定浓度5nM的抗体G1 Fab片段(要位于或低于基于溶液的相互作用的预期 K_D)与3-倍连续稀释中终浓度跨越1nM到1 μ M的竞争肽预孵育,所述竞争肽为大鼠 α -CGRP或F37A (19-37)人 α -CGRP。不存在或存在基于溶液的竞争肽时,将抗体G1 Fab溶液越过芯片上的CGRP注入,并监控由溶液竞争导致的在芯片表面上检测到的结合应答缺失。使用校正曲线将这些结合应答转化为“游离Fab浓度”,所述曲线通过将抗体G1 Fab单独(5、2.5、1.25、0.625、0.325和0nM)越过芯片上的CGRP滴定构建。“游离Fab浓度”针对用于产生每个数据点的基于溶液的竞争性肽的浓度绘制,并使用BIAevaluation软件与溶液亲和力模型拟合。通过该途径(直接)测定的溶液亲和力在表5和7中显示,并用于确认在Fab穿过N生物素化的CGRP被直接注入SA芯片上时获得的亲和力。通过这两种方法测定的亲和力的密切一致证实了N生物素化形式的CGRP与芯片的结合不改变其天然溶液结合活性。

[0314] 下表5显示了通过将Fab片段流过SA芯片上N生物素化的CGRP,通过Biacore测定的抗体G1对人 α -CGRP、人 β -CGRP、大鼠 α -CGRP和大鼠 β -CGRP的亲合力。为了更好地分析具有极低解离速率的结合相互作用的亲和力,还在两部分实验中测定亲和力以补充该实验方向,还测定了大鼠 α -CGRP相互作用的溶液亲和力(如上所述)。在两个实验方向中测量的亲和力的密切一致证实当溶液中天然大鼠 α -CGRP被N生物素化并结合在SA芯片上时,其亲合力未被改变。

[0315] 表5. 穿过芯片上的CGRP滴定的抗体G1 Fab的亲合力

[0316]

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

[0317] *在高分辨率两部分实验中测定 α -CGRP(大鼠和人)的亲和力,其中解离相被监测2小时(k_{on} 、 k_{off} 和 K_D 的值表示n份重复的平均值,标准偏差以百分比方差表示)。对 β -CGRP(大鼠和人)的亲和力使用仅20分钟解离相通过总体分析测定,其不足够准确到定量它们的极端解离速率(它们的解离速率可能比此处阐述的更慢,从而它们的亲和力可能甚至更高)。抗体G1Fab以下述解离速率从所有的CGRP(除 α -大鼠CGRP外)上极端缓慢地解离,所述解离速率达到Biacore实验的分辨率极限(特别是在25°C下)。

[0318] **通过测量结合应答的缺失测定的溶液亲和力,所述结合应答由用于抗体G1Fab的芯片上的CGRP探测,所述芯片用基于溶液的大鼠 α -CGRP竞争剂预孵育。

[0319] 下表6显示了与抗体G1相比具有氨基酸序列变化的抗体和它们对大鼠 α -CGRP和人 α -CGRP的亲和力。表6中所示变体的所有氨基酸替换是相对于G1的序列描述的。Fab片段的亲合力通过将它们流经SA芯片上的CGRP通过Biacore测定。

[0320] 表6. 通过Biacore在37°C下测定的抗体G1变体的氨基酸序列和亲合力数据。

[0321]

克隆	L1	L2	H2	HC-FW3	α -大鼠 k_{off} (1/s)	α -大鼠 K_D (nM)	α -人 k_{off} (1/s)	α -人 K_D (nM)
G1					3.99×10^{-3}	2.57	3.63×10^{-5}	0.063
M1				A100L	1.10×10^{-3}		1.73×10^{-4}	
M2				L99A A100R	2.6×10^{-3}	58	3.1×10^{-4}	3
M3				L99A A100S	2.0×10^{-3}	61	2.1×10^{-4}	1.7
M4				L99A A100V	1.52×10^{-3}	84.4	6.95×10^{-5}	0.43
M5				L99A A100Y	7.35×10^{-4}	40.8	3.22×10^{-5}	0.20
M6				L99N	7.84×10^{-4}	43.6	1.33×10^{-4}	0.83
M7				L99N A100C	9.18×10^{-4}	51.0	2.43×10^{-4}	1.52
M8				L99N A100G	7.45×10^{-4}	41.4	9.20×10^{-5}	0.58
M9				L99N A100Y	n.d.	n.d.	1.00×10^{-5}	0.06
M10				L99S A100S	1.51×10^{-3}	83.9	1.73×10^{-4}	1.08
M11				L99S A100T	4.83×10^{-3}	268.3	2.83×10^{-4}	1.77
M12				L99S A100V	1.94×10^{-3}	107.8	1.01×10^{-4}	0.63
M13				L99T A100G	1.84×10^{-3}	102.2	1.86×10^{-4}	1.16
M14				L99T A100K	n.d.	n.d.	1.00×10^{-5}	0.06
M15				L99T A100P	1.15×10^{-3}	63.9	1.58×10^{-5}	0.10
M16				L99T A100S	9.96×10^{-4}	55.3	1.65×10^{-4}	1.03
M17				L99T A100V	2.06×10^{-3}	114.4	1.85×10^{-4}	1.16
M18				L99V A100G	1.22×10^{-3}	67.8	7.03×10^{-5}	0.44
M19				L99V A100R	n.d.	n.d.	1.00×10^{-5}	0.06

[0322]

克隆	L1	L2	H2	HC-FW3	α -大鼠 k_{off} (1/s)	α -大鼠 K_D (nM)	α -人 k_{off} (1/s)	α -人 K_D (nM)
M20	R28W			L99R A100L	1.44×10^{-3}	80.0	1.36×10^{-4}	0.85
M21	R28W			L99S	6.95×10^{-4}	15.2	1.42×10^{-4}	1.23
M22	R28W			L99T	1.10×10^{-3}	61.1	1.16×10^{-4}	0.73
M23	R28G			L99T A100V	7.99×10^{-4}	44.4	1.30×10^{-4}	0.81
M24	R28L			L99T A100V	1.04×10^{-3}	57.8	1.48×10^{-4}	0.93
M25	R28N			L99T A100V	1.4×10^{-3}	76	1.4×10^{-4}	1.3
M26	R28N		A57G	L99T A100V	9.24×10^{-4}	51.3	1.48×10^{-4}	0.93
M27	R28N T30A			L99T A100V	3.41×10^{-3}	189.4	3.57×10^{-4}	2.23
M28	R28N T30D		E54R A57N	L99T A100V	1.25×10^{-3}	69.4	9.96×10^{-5}	0.62
M29	R28N T30G			L99T A100V	3.59×10^{-3}	199.4	3.80×10^{-4}	2.38
M30	R28N T30G		E54K A57E	L99T A100V	6.38×10^{-3}	354.4	5.90×10^{-4}	3.69
M31	R28N T30G		E54K A57G	L99T A100V	3.61×10^{-3}	200.6	3.47×10^{-4}	2.17
M32	R28N T30G		E54K A57H	L99T A100V	2.96×10^{-3}	164.4	2.71×10^{-4}	1.69
M33	R28N T30G		E54K A57N S58G	L99T A100V	9.22×10^{-3}	512.2	7.50×10^{-4}	4.69
M34	R28N T30G		E54K A57N S58T	L99T A100V	2.17×10^{-3}	120.6	6.46×10^{-4}	4.04
M35	R28N T30G		E54K A57S	L99T A100V	3.99×10^{-3}	221.7	3.39×10^{-4}	2.12
M36	R28N T30R			L99T A100V	4.79×10^{-3}	266.1	2.39×10^{-4}	1.49
M37	R28N T30S		A57G	L99T A100V	1.45×10^{-3}	80.6	2.26×10^{-4}	1.41
M38	R28N T30W			L99T A100V	5.11×10^{-3}	283.9	2.18×10^{-4}	1.36
M39	R28N	G50A L56T	A57N S58Y	L99T A100V	9.95×10^{-3}	552.8	4.25×10^{-4}	2.66
M40	R28N	G50A L56T	E54K A57L	L99T A100V	0.36	20000.0	1.28×10^{-3}	8.00
M41	R28N	G50A L56T	E54K A57N E64D	L99T A100V	4.53×10^{-3}	251.7	2.10×10^{-4}	1.31
M42	R28N	G50A L56T	E54K A57N H61F	L99T A100V	7.52×10^{-3}	417.8	4.17×10^{-4}	2.61
M43	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58C	L99T A100V	4.53×10^{-3}	251.7	2.63×10^{-4}	1.64
M44	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	6.13×10^{-3}	443	2.10×10^{-4}	2.05
M45	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	5.58×10^{-3}	259	2.11×10^{-4}	1.85

[0323]

克隆	L1	L2	H2	HC-FW3	α -大鼠 k_{off} (1/s)	α -大鼠 K_D (nM)	α -人 k_{off} (1/s)	α -人 K_D (nM)
			E64D					
M46	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E H61F	L99T A100V	2.94×10^{-3}	163.3	5.39×10^{-4}	3.37
M47	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58G	L99T A100V	8.23×10^{-3}	457.2	3.32×10^{-4}	2.08
M48	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58L	L99T A100V	0.0343	1905.6	8.42×10^{-4}	5.26
M49	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58Y H61F	L99T A100V	0.0148	822.2	5.95×10^{-4}	3.72
M50	R28N	G50A L56T	E54K A57R	L99T A100V	5.30×10^{-3}	294.4	4.06×10^{-4}	2.54
M51	R28N	L56I	E54K A57G	L99T A100V	1.18×10^{-3}	65.6	1.31×10^{-4}	0.82
M52	R28N	L56I	E54K A57N S58A	L99T A100V	2.29×10^{-3}	127.2	2.81×10^{-4}	1.76
M53	R28N	L56I	E54K A57N S58G	L99T A100V	1.91×10^{-3}	106.1	3.74×10^{-4}	2.34
M54	R28N T30A	G50A	E54K A57N S58P	L99T A100V	2.16×10^{-3}	120.0	1.79×10^{-3}	11.19
M55	R28N T30A	L56S	E54K A57N S58E E64D	L99T A100V	5.85×10^{-3}	325.0	4.78×10^{-4}	2.99
M56	R28N T30D	L56S	E54K A57N H61F	L99T A100V	9.35×10^{-3}	519.4	4.79×10^{-4}	2.99
M57	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58E	L99T A100V	<u>0.0104</u>	<u>1.200</u>	<u>3.22×10^{-4}</u>	<u>3.08</u>
M58	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58I H61F	L99T A100V	未结合	n.d.	1.95×10^{-3}	12.19
M59	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58N H61F	L99T A100V	0.0123	683.3	5.24×10^{-4}	3.28
M60	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58R H61F	L99T A100V	0.0272	1511.1	9.11×10^{-4}	5.69
M61	R28N T30G	A51H	E54Q A57N H61F	L99T A100V	5.21×10^{-3}	289.4	4.59×10^{-4}	2.87
M62	R28N T30G	A51H L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	<u>5.75×10^{-3}</u>	<u>242</u>	<u>5.57×10^{-4}</u>	<u>5.86</u>
M63	R28N	G50A	E54K	L99T	2.65×10^{-3}	147.2	1.50×10^{-3}	9.38

[0324]

克隆	L1	L2	H2	HC-FW3	α -大鼠 k_{off} (1/s)	α -大鼠 K_D (nM)	α -人 k_{off} (1/s)	α -人 K_D (nM)
	T30G		A57N S58T	A100V				
M64	R28N T30G	G50A	E54K A57N S58V	L99T A100V	0.0234	1300.0	1.32×10^{-3}	8.25
M65	R28N T30G	G50A L56I	E54K A57C	L99T A100V	4.07×10^{-3}	226.1	8.03×10^{-4}	5.02
M66	R28N T30G	L56I	E54K A57E	L99T A100V	5.11×10^{-3}	283.9	5.20×10^{-4}	3.25
M67	R28N T30G	L56I	E54K A57F	L99T A100V	1.71×10^{-3}	95.0	8.20×10^{-4}	5.13
M68	R28N T30G	L56I	E54K A57N S58D E64D	L99T A100V	6.76×10^{-3}	375.6	4.28×10^{-4}	2.68
M69	R28N T30G	L56I	E54K A57N S58E	L99T A100V	1.81×10^{-3}	100.6	7.33×10^{-4}	4.58
M70	R28N T30G	L56I	E54K A57S	L99T A100V	6.07×10^{-3}	337.2	5.59×10^{-4}	3.49
M71	R28N T30G	L56I	E54K A57Y	L99T A100V	2.12×10^{-3}	117.8	1.28×10^{-3}	8.00
M72	R28N T30G	L56S	E54K	L99T A100V	3.95×10^{-3}	219.4	4.00×10^{-4}	2.50
M73	R28N T30G	L56S	E54K A57N S58Y E64D	L99T A100V	3.00×10^{-3}	166.7	2.55×10^{-4}	1.59
M74	R28N T30G	L56S	E54K A57S	L99T A100V	6.03×10^{-3}	335.0	5.97×10^{-4}	3.73
M75	R28N T30G	L56S	E54K A57V	L99T A100V	1.87×10^{-2}	1038.9	1.16×10^{-3}	7.25
M76	R28N T30S	G50A L56T	A57G	L99T A100V	1.16×10^{-3}	64.4	3.64×10^{-4}	2.28
M77	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57D	L99T A100V	0.0143	794.4	4.77×10^{-4}	2.98
M78	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57N S58T	L99T A100V	0.167	9277.8	1.31×10^{-3}	8.19
M79	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57P	L99T A100V	0.19	10555.6	1.29×10^{-3}	8.06
M80	R28N T30S	L56I	E54K A57N S58V	L99T A100V	0.0993	5516.7	2.09×10^{-3}	13.06
M81	R28N T30S	L56S	E54K A57N S58E	L99T A100V	4.29×10^{-3}	238.3	4.90×10^{-4}	3.06
M82	R28N T30V	A51H L56T	A57N	L99T A100V	6.99×10^{-3}	388.3	8.77×10^{-4}	5.48
M83	R28N T30V	A51H L56T	E54K A57N S58M H61F	L99T A100V	未结合	n.d.	9.33×10^{-4}	5.83
M84	R28N T30V	A51H L56T	E54N A57N	L99T A100V	1.76×10^{-2}	977.8	1.08×10^{-3}	6.75

[0325] 所有的CDR包括Kabat和Chothia CDR。氨基酸残基连续编号(见图5)。所有的克隆具有与G1相同的L3+H1+H3序列。

[0326] $KD = k_{off}/k_{on}$ 除了加下划线的是通过Fab浓度系列的总体分析获得的(G1在高分辨率模式中分析)以外,所有的 k_{off} 值在筛选模式中测定。因此,加下划线的 K_D 值通过测量 k_{on} 实验测定。其它的 k_{on} 值被评价为与M25相同。

[0327] n.d.=未测定

[0328] 为了测定被抗体G1识别的人 α -CGRP上的表位,使用上述的Biacore实验。购买N-生物素化版本的人 α -CGRP,使得其能够通过SA感受芯片高亲和力捕获。测定不存在或存在VGRP肽时G1 Fab片段与芯片上的人 α -CGRP的结合。典型地,将2000:1mol的肽/Fab溶液(例如50nM G1Fab中的10 μ M肽)越过人 α -CGRP注射在芯片上。图6显示被竞争肽封闭的结合百分比。图6中显示的数据指出封闭100%的G1 Fab对人 α -CGRP结合的肽是人 α -CGRP的1-37(WT)、8-37、26-37、P29A(19-37)、K35A(19-37)、K35E(19-37)和K35M(19-37); β -CGRP(WT)的1-37;大鼠 α -CGRP(WT)的1-37;和大鼠 β -CGRP(WT)的1-37。所有这些肽在C末端被酰胺化。人 α -CGRP的肽F37A(19-37)和19-37(后者在C末端未被酰胺化)也封闭了G1Fab对人 α -CGRP结合的约80%到90%。人 α -CGRP的肽1-36(C末端未酰胺化)封闭了G1Fab对人 α -CGRP结合的约40%。人 α -CGRP的肽片段19-36(C末端被酰胺化);人 α -CGRP的肽片段1-13和1-19(其C末端均未被酰胺化);和人淀粉不溶素、降钙素和肾上腺髓质素(均在C末端被酰胺化)不与G1 Fab竞争结合芯片上的人 α -CGRP。这些数据证明G1靶向CGRP的C末端表位,最末端残基(F37)的识别及其酰胺化对于结合均是重要的。

[0329] 还测定了G1 Fab对人 α -CGRP变体的结合(37°C下)。表7显示了通过将G1 Fab越过芯片上的N生物素化的人 α -CGRP和变体滴定直接测量的亲和力。表7中的数据表明:抗体G1结合C末端的表位,F37和G33是最重要的残基。当在C末端(其被酰胺化)添加额外的氨基酸残基(丙氨酸)时,G1不结合CGRP。

[0330] 表7.37°C下测量的G1 Fab对人 α -CGRP和变体(它们的氨基酸序列参见表4)的亲合力

[0331]

芯片上的CGRP	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
1-37 (WT)	4.68×10^5	7.63×10^{-5}	0.16 (高分辨率 $K_D=0.06$)
19-37	4.60×10^5	7.30×10^{-5}	0.16
25-37	3.10×10^5	8.80×10^{-5}	0.28
F27A (25-37)	3.25×10^5	1.24×10^{-4}	0.38
V28A (25-37)	3.32×10^5	9.38×10^{-5}	0.28
P29A (25-37)	2.26×10^5	1.78×10^{-4}	0.79
T30A (25-37)	1.79×10^5	8.41×10^{-5}	0.47
N31A (25-37)	2.17×10^5	1.14×10^{-4}	0.53
V32A (25-37)	2.02×10^5	3.46×10^{-4}	1.71
G33A (25-37)	2.07×10^5	0.0291	141

[0332]

芯片上的CGRP	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
S34A (25-37)	2.51×10^5	7.64×10^{-4}	3.04
K35A (19-37)	2.23×10^5	2.97×10^{-4}	1.33
K35E (19-37)	5.95×10^4	5.79×10^{-4}	9.73
K35M (19-37)	2.63×10^5	1.34×10^{-4}	0.51
K35Q (19-37)	1.95×10^5	2.70×10^{-4}	1.38

F37A (25-37)	8.90×10^4	8.48×1^{-3}	95 (溶液 $K_D=172\text{nM}$)
38A (25-38A)	—	—	未检测到结合

[0333] 上述数据指出抗体G1结合的表位位于人 α -CGRP的C末端上,且人 α -CGRP上的氨基酸33和37对于抗体G1的结合是重要的。残基F37的酰胺化对于结合也是重要的。

[0334] 实施例5:抗CGRP拮抗剂抗体G1对大鼠隐神经刺激诱导的皮肤血管扩张的作用

[0335] 为了测试抗CGRP抗体G1的拮抗剂活性,使用实施例3中所述大鼠模型测试抗体对大鼠隐神经刺激引起的皮肤血管扩张的作用。简言之,用2%的异氟烷将大鼠维持麻醉。在实验开始时给予溴苄铵 (30mg/kg, 静脉施用) 以最小化隐神经的交感神经纤维伴随刺激引起的血管收缩。通过使用与温度受控的加热毯连接的直肠探头将体温维持在37°C。手术暴露右后肢的隐神经,最接近地切割并用塑料膜覆盖以防干燥。将激光多普勒探头置于后爪皮肤的背中部上,其为隐神经支配的区域。用激光多普勒流量计监测皮肤血流(测量为血细胞通量)。在注射溴苄铵后三十到四十五分钟测定注射两小时内抗体作用的实验中,当稳定的基线通量(少于5%的变化)被建立至少5分钟时,将神经置于铂双极电极上并用电刺激(2Hz, 10V, 1ms, 持续30秒),20分钟后再次刺激。使用应答这两次刺激的血流通量的平均值建立对电刺激的基线应答(时间0)。然后静脉(i.v.)施用抗体G1 (1mg/kg或10mg/kg) 或媒介(与10mg/kg G1等体积的含0.01%吐温20的PBS)。随后,在抗体施用后30分钟、60分钟、90分钟和120分钟刺激(2Hz, 10V, 1ms, 持续30秒)神经。在大约三小时的时间段中保持动物麻醉。对于应答电脉冲刺激的每个通量而言,通过通量-时间曲线下的面积(AUC,其等于通量的改变乘以时间的改变)评价皮肤血流的累积变化。

[0336] 如图7所示,当在抗体施用后90分钟电刺激隐神经时,与运载体相比,通过在隐神经上应用电脉冲刺激的血流增加被1mg/kg的抗体G1(静脉施用)的存在显著抑制。当在抗体施用后90分钟和120分钟电刺激隐神经时,与运载体相比,通过在隐神经上应用电脉冲刺激的血流增加被10mg/kg的抗体G1(静脉施用)的存在显著抑制。

[0337] 在隐静脉实验中更长的时间点测定抗体作用的实验中,在制备用于上述隐神经刺激的动物前24小时或7天,对大鼠静脉注射指定剂量的抗体。在这些实验中,可能在给药前在个体大鼠中建立对电脉冲刺激的基线应答,从而将处理组与在24小时或7天用媒介(PBS, 0.01%吐温20)给药的动物进行比较。

[0338] 如图8A和8B中所示,与刺激前24小时或7天用媒介给药的组相比,在相同时间点,在用10mg/kg或3mg/kg G1给药的动物组中,后爪中背部皮肤中由隐神经刺激激发的血流增加被显著抑制。

[0339] 图8C示出了对图8A和8B中所示剂量应答数据进行的曲线拟合分析,以确定50%最大作用(EC50)所需的剂量。24小时的EC50为1.3mg/kg,而7天的EC50略低(0.8mg/kg)。

[0340] 实施例6:硬脊膜动脉(封闭式颅窗)实验中抗CGRP拮抗剂抗体G1的急性作用

[0341] 封闭式颅窗模型:该实验的目的在于测定抗CGRP拮抗剂抗体的急性作用,并将其与CGRP受体拮抗剂BIBN4096BS的急性作用比较。如前所述(Williamson et al., Cephalalgia 17(4):518-24(1997))用以下修饰进行实验。用70mg/kg腹腔内的戊巴比妥麻醉Sprague Dawley大鼠(300-400g)。用20mg/kg/hr的静脉戊巴比妥维持麻醉。通过颈静脉对大鼠插管用于递送所有药物。用通过股动脉旋入腹主动脉中的探头(mikro-tip导管, Millar Instruments)监测血压。将大鼠气管切开并将呼吸速率维持在每分钟75次3.5mL体

积的呼吸。将头固定在定向器具上并去除头皮,通过用牙钻弄薄骨头在矢状缝的侧面左壁区域制造一个2x6mm的窗口。施用显微操作器将铂双极电极降低至表面上并用重矿物油覆盖。在电极窗口的侧面创建5x6mm的另一窗口并用重矿物油填充,通过该窗口用CCD照相机和视频尺寸分析器(Living Systems)持续监测脑膜中动脉(MMA)分支的直径。制备后让大鼠休息不少于45分钟。建立对电刺激的基线应答(15V,10hz,0.5ms脉冲,持续30秒),然后用实验化合物(10mg/kg mu7E9、300µg/kg BIBN4096BS或PBS 0.01%吐温20)对大鼠静脉给药。在给药后5(BIBN4096BS)、30、60、90和120分钟进行其它电刺激。使用制图软件(ADInstruments)记录所有的数据。如图9所示,10mg/kg的mu7E9在给药后60分钟内显著地封闭了电场刺激激发的MMA扩张并在实验的持续时间(120分钟)中维持了该作用。比较而言,BIBN4096BS在给药的5分钟内封闭MMA扩张,但是该作用在90分钟时完全消失。封闭的强度在BIBN4096BS和mu7E9之间是相当的。

[0342] 实施例7:抗CGRP拮抗剂抗体G1在脑脊膜动脉(封闭式颅窗)实验中的慢性作用

[0343] 该实验的目的在于测定给药后7天抗CGRP抗体是否仍然能够封闭电刺激的MMA扩张。大鼠的制备与上述急性实验(实施例6)相同,但是有以下例外。在创建封闭式颅窗制剂和刺激之前7天对大鼠静脉注射(10mg/kg、3mg/kg或1mg/kg G1)。不可能像急性实验中那样在给药前建立对电刺激的基线扩张应答,所以将抗体组与媒介(PBS,0.01%吐温20)给药的对照组中的MMA扩张进行比较。大鼠被允许休息不少于45分钟后,以30分钟的间隔对硬脑膜进行电刺激。刺激处于2.5V、5V、10V、15V和20V,均在10hz、0.5ms脉冲下持续30秒。

[0344] 如图10中所示,10mg/kg和3mg/kg的G1显著地封闭了10到20伏特范围内电刺激激发的MMA扩张。该数据证明G1能够最多在给药后7天封闭电刺激的MMA扩张。

[0345] 实施例8:吗啡停药热潮红模型

[0346] 吗啡停药大鼠模型是用于绝经期热潮红机制的确定的啮齿动物模型(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))。基本上通过在皮下植入吗啡小球使大鼠对吗啡上瘾。上瘾后用纳洛酮(阿片拮抗剂)注射动物,这使得它们立刻被停药。该停药伴随着皮肤温度上升、核心体温下降、心率提高和血清黄体生成素提高。这些在强度和时间上均与发生在人热潮红中的相似(Simpkins et al.,Life Sciences 32:1957-1966(1983))。另外,如果在诱导停药前用雌二醇治疗大鼠,则热潮红的症状被减少(Merchenthaler et al.,Maturitas 30:307-316(1998))。这是吗啡停药模型被认为模拟临床热潮红的原因。

[0347] 卵巢切除的大鼠从Charles River Laboratories定制。卵巢切除后不少于7天时通过皮下植入吗啡小球(75mg吗啡碱)创建吗啡依赖性。两天后再植入两个小球。下一天对大鼠静脉注射10mg/kg 4901[**]或媒介(PBS,0.01%吐温)。第二次植入小球后两天,用氯胺酮(90mg/kg)麻醉并轻微抑制大鼠。将表面温度热电偶粘在尾巴底部并使用直肠热电偶测量核心温度。使用Chart软件(ADInstruments)记录数据。将稳定基线温度记录15分钟后,皮下注射纳洛酮(1mg/kg)。在接下来的60分钟内连续记录温度。结果显示在图11A和11B中。

[0348] 应理解本文所述的实施例和实施方案仅用于阐述的目的,由其启发的多种修饰和改变应被提示给本领域技术人员,并且包括在本申请的内容和范围内。本文所述的所有出版物、专利和专利申请通过参考整体并入本文用于所有目的,就如同每个个体出版物、专利

或专利申请被特别地和单独地指明通过参考被并入一样。

[0349] 生物材料的保藏

[0350] 以下的材料已经保藏于American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA (ATCC):

[0351]

材料	抗体No.	ATCC编号No.	保藏日期
pDb.CGRP.hFcGI	G1重链	PTA-6867	2005年7月15日
pEb.CGRP.hKGI	G1轻链	PTA-6866	2005年7月15日

[0352] 载体pEb.CGRP.hKGI是编码G1轻链可变区和轻链κ恒定区的多核苷酸;载体pDb.CGRP.hFcGI是编码G1重链可变区和重链IgG2恒定区的多核苷酸,其含有以下突变:A330P331到S330S331(氨基酸编码参考野生型IgG2序列;参阅Eur.J.Immunol.(1999) 29: 2613-2624)。

[0353] 这些保藏遵从国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约(Budapest Treaty)及其规章的规定进行。这确保保藏的存活培养物从保藏日起被维持30年。根据布达佩斯条约的规定,保藏物可以从ATCC获得,并且遵循Rinat Neuroscience Corp.与ATCC之间的an1协议,所述协议确保:相关U.S.专利公布或任何U.S.或外国专利申请公开后(先公开为准),保藏的培养物后代永久和无限制地能够被公众获得,并根据35USC Section 122及其Commissioner's规则(包括37 CFR Section 1.14,尤其是指8860G 638)确保U.S.Commissioner of Patents and Trademarks授权的人能够获得所述后代。

[0354] 本专利申请的受让人已经同意,如果保存材料的培养物在合适的条件下培养时将要死亡或丢失或损坏,将在通知后迅速用另一相同材料替换。保藏材料的可获得性不应被解释为可以违背任何政府当局根据其专利法授予的权利来实施本发明的许可。

[0355] 抗体序列

[0356] G1重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:1)

[0357] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASATHYAEAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQGLTVTVSS

[0358] G1轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:2)

[0359] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIK

[0360] G1 CDR H1(扩展的CDR)(SEQ ID NO:3)

[0361] GFTFSNYWIS

[0362] G1 CDR H2(扩展的CDR)(SEQ ID NO:4)

[0363] EIRSESDASATHYAEAVKG

[0364] G1 CDR H3(SEQ ID NO:5)

[0365] YFDYGLAIQNY

[0366] G1 CDR L1(SEQ ID NO:6)

[0367] KASKRVTTYVS

[0368] G1 CDR L2(SEQ ID NO:7)

[0369] GASNRYL

[0370] G1 CDR L3 (SEQ ID NO:8)

[0371] SQSYNPYT

[0372] G1重链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO.9)

[0373] GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCTGCGTCTGTCCTGCGCT
GCTTCCGGTTTACCTTCTCCAATACTGGATCTCCTGGGTTCGTCAGGCTCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGCTG
TGAAATCCGTTCCGAATCCGACGCTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTAAAGGTCGTTTACCATCTCCCGTG
ACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTGCTGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCCTGGCT
TACTTTGACTACGGTCTGGCTATCCAGAACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCCTCC

[0374] G1轻链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO:10)

[0375] GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCAGGTGAACGTGCTACCCTGTCTGCTG
AAAGCTTCCAAACGGGTTACCACCTACGTTTCTGGTACCAGCAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCGTCTGCTGATCTA
CGGTGCTTCCAACCGTTACCTCGGTATCCCAGCTCGTTTCTCCGGTCCGGTCCGGTACCGACTTCACCCTGACCA
TCTCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTCAGTCCTACAACCTACCCCTACACCTTCGGTCAG
GGTACCAAACCTGGAAATCAAA

[0376] G1重链全抗体氨基酸序列 (包括本文所述的经修饰的IgG2) (SEQ ID NO:11)

[0377] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKLEWVAEIRSESDASATHYAEAVKGR
FTISRDNKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0378] G1轻链全抗体氨基酸序列 (SEQ ID NO:12)

[0379] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGI PARFSGSGSGT
DFTLTITSSLEPEDFAVYYCSQSYNPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0380] G1重链全抗体核苷酸序列 (包括本文所述的经修饰的IgG2) (SEQ ID NO:13)

[0381] GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCTGCGTCTGTCCTGCGCT
GCTTCCGGTTTACCTTCTCCAATACTGGATCTCCTGGGTTCGTCAGGCTCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGCTG
TGAAATCCGTTCCGAATCCGACGCTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTAAAGGTCGTTTACCATCTCCCGTG
ACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTGCTGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCCTGGCT
TACTTTGACTACGGTCTGGCTATCCAGAACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCCTCCGCCTCCACCAA
GGGCCCATCTGTCTTCCCACTGGCCCCATGTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCAGAACCTGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAGCT
GTCCTGCAGTCCTCAGGTCTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTA
CACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTCGACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGTGTGTGGAGTGTC
CACCTTGTCCAGCCCCTCCAGTGCCGGACCATCCGTGTTCTGTCCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATC
TCCAGAACCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATGT
GGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCAAGAGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTCAGAGTGGTGAGCG
TGCTGACCGTGGTGACCAAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCATCC

AGCATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATACCCTGCCCCCATCCAGAGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCGACATCGCCGTGGAGTGGG
AGTCCAACGGACAGCCAGAGAACAACCTATAAGACCACCCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGATCCTTCTTCCTGTAT
TCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAACGTGTTCTCTTGTTCGGTGATGCACGAGGCCCTGCA
CAACCACTATACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCAGGAAAAGTAA

[0382] G1轻链全抗体核苷酸序列 (SEQ ID NO:14) :

[0383] GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCCAGGTGAACGTGCTACCCTGTCTGC
AAAGCTTCCAMCGGGTTACCACCTACGTTTCCTGGTACCAGCAGAAAACCCGGTCAGGCTCCTCGTCTGCTGATCTAC
GGTGCTTCCAACCGTTACCTCGGTATCCCAGCTCGTTTCTCCGGTTCGGGTACCGACTTCACCCTGACCAT
CTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTCAGTCCTACAACCTACCCCTACACCTTCGGTCAGG
GTACCAAACCTGGAAATCAAACGCACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCCGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCGCGCGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA
CGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA
CCCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCT
CCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGCTAA

[0384] 人和大鼠 CGRP 的氨基酸序列比较 (人 α -CGRP (SEQ ID NO:15)、人 β -CGRP (SEQ ID NO:43)、大鼠 α -CGRP (SEQ ID NO:41); 和大鼠 β -CGRP (SEQ ID NO:44)) :

[0385] NH_2 -ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (人 α -CGRP)

[0386] NH_2 -ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKS NFVPTNVGSKAF-CONH₂ (人 β -CGRP)

[0387] NH_2 -SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSEAF-CONH₂ (大鼠 α -CGRP)

[0388] NH_2 -SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (大鼠 β -CGRP)。

序列表

<110> 礼纳特神经系统科学公司

乔格·泽勒

克里斯顿·波尔森

雅斯米纳·阿迪石

尧姆·庞斯

西尔若·琼斯

安依·露森达尔

<120> 针对降钙素基因相关肽的拮抗剂抗体及其使用方法

<130> PC19499A

<160> 47

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体的重链可变区

<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

[0001]

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

Ala Glu Ile Arg Ser Glu Ser Asp Ala Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
65 70 75 80

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

Tyr Cys Leu Ala Tyr Phe Asp Tyr Gly Leu Ala Ile Gln Asn Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体的轻链可变区

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Lys Arg Val Thr Thr Tyr

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

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化抗体的CDR H1

<400> 3

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

[0002]

<210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化抗体的CDR H2

<400> 4

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

Val Lys Gly

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化抗体的CDR H3

<400> 5

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

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体的CDR L1

<400> 6

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

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体的CDR L2

<400> 7

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Leu
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体的CDR L3

<400> 8

Ser Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr Thr
1 5

[0003]

<210> 9

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体的重链可变区

<400> 9

gaagttcagc tggttgaatc cggtagtggt ctggttcagc caggtggttc cctgcgtctg	60
tcttgcgctg ctcccggttt caccctctcc aactactgga tctcctgggt tcgtcaggct	120
cctggtaaag gtctggaatg ggtagctgaa atccgttccg aatccgacgc gtccgctacc	180
cattacgctg aagctgtaaa aggtcgtttc accatctccc gtgacaacgc taagaactcc	240
ctgtacctgc agatgaactc cctgcgtgct gaagacaccg ctgtttacta ctgccctggct	300
tactttgact acggtctggc tatccagaac tactgggggc aggggtaccct gggtaccgtt	360
tcctcc	366

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体的轻链可变区

<400> 10

gaaatcggtc tgacctcagtc cccggctacc ctgtccctgt ccccgaggtga acgtgctacc	60
ctgtcctgca aagcttccaa acgggttacc acctacgttt cctggtacca gcagaaaccc	120
ggtcaggctc ctctctctgt gatctacggt gttccaacc gttacctcgg tatccagct	180

```

cgtttctcgc gttccgggttc cggtagccgac ttcaacctga ccattctctc cctggaaccc 240
gaagacttcg ctgtttacta ctgcagtcag tcttacaact accctacac ctteggtcag 300
ggtaccaaac tggaaatcaa a 321

```

<210> 11
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 全长的人源化抗体重链

<400> 11

```

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

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20           25           30

```

```

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

```

```

Ala Glu Ile Arg Ser Glu Ser Asp Ala Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
50           55           60

```

```

Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
65           70           75           80

```

[0004] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

```

Tyr Cys Leu Ala Tyr Phe Asp Tyr Gly Leu Ala Ile Gln Asn Tyr Trp
100           105           110

```

```

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115           120           125

```

```

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130           135           140

```

```

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145           150           155           160

```

```

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165           170           175

```

```

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180           185           190

```

```

Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195           200           205

```

```

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
210           215           220

```

```

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
225           230           235           240

```

.. —

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

[0005]

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 全长的人源化抗体轻链

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

[0006] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 1347
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 全长的人源化抗体重链

<400> 13
gaagttcagc tggttgaatc cgggtggtgt ctggttcagc caggtgggtc cctgcgtctg 60
tcttgcgctg ctcccggttt caccttctcc aactactgga tctcctgggt tcgtcaggct 120
cctggtaaag gtctggaatg ggttgcgtgaa atccgttccg aatccgacgc gtccgctacc 180
cattacgctg aagctgttaa aggtcgtttc accatctccc gtgacaacgc taagaactcc 240
ctgtacctgc agatgaactc cctgcgtgct gaagacacgc ctgtttacta ctgcttggt 300
tactttgact acggtctggc tatccagaac tactggggtc aggggtaccct ggttaccgtt 360
tcctccgcct ccaccaaggg cccatctgtc ttcceactgg ccccatgctc ccgcagcacc 420
tccgagagca cagccgcctt gggtgcctg gtcaaggact acttcccaga acctgtgacc 480
gtgtcctgga actctggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ctttcccagc tgtcctgcag 540
tcctcaggte tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc catccagcaa ctccggcacc 600
cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag ccaagcaaca ccaaggtcga caagaccgtg 660

gagagaaagt gttgtgtgga gtgtccacct tgtccagccc ctccagtggc cggaccatcc 720
 gtgttctctgt tccctccaaa gccaaaggac accctgatga tctccagaac cccagaggtg 780
 acctgtgtgg tgggtggacgt gtcccacgag gaccagagg tgcagttcaa ctggatatgtg 840
 gacggagtgagg aggtgcacaa cgccaagacc aagccaagag aggagcagtt caactccacc 900
 ttcagagtgg tgagcgtgct gaccgtgggtg caccaggact ggctgaacgg aaaggagtat 960
 aagtgttaagg tgtccaacaa gggactgccca tccagcatcg agaagacat ctccaagacc 1020
 aagggacagc caagagagcc acaggtgtat accctgcccc catccagaga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtcctctgac ctgtctgtgtg aagggtattct atccatccga catcgccgtg 1140
 gagtgggagt ccaacggaca gccagagaac aactataaga ccaccctcc aatgctggac 1200
 tccgacggat ctttcttctt gtattccaag ctgaccgtgg acaagtccag atggcagcag 1260
 ggaaacgtgt tctcttgttc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta taccagaag 1320
 agcctgtccc tgtctccagg aaagtaa 1347

<210> 14
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 全长的人源化抗体轻链

[0007] <400> 14
 gaaatcgttc tgaccagtc cccggtacc ctgtccctgt cccaggtga acgtgctacc 60
 ctgtcctgca aagcttccaa acgggttacc acctacgttt cctggtacca gcagaaaccc 120
 ggtcaggtc ctcgtctgct gatctacggt gttccaacc gttacctcg tatccagct 180
 cgtttctccg gttccggttc cggtagcagc ttacacctga ccatctctc cctggaaccc 240
 gaagacttc ctgtttacta ctgcagtcag tctacaact acctacac ctccggtcag 300
 ggtaccaaac tggaataca acgactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctccctcca 360
 tctgatgagc agttgaaac cggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 ccgcgcgagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatccg taactccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagttctc cagtcacaaa gagcttcaac cgcggtgagt gctaa 645

<210> 15
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 15

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

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

Gly Ser Lys Ala Phe
35

<210> 16
<211> 30
<212> PRT
<213> 人

<400> 16

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

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

<210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> 人

<400> 17

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

Lys Ala Phe

<210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

[0008] <220>
<223> 人alpha-CGRP片段的变体

<400> 18

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

Lys Ala Phe

<210> 19
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 片段, 人alpha-CGRP的变体

<400> 19

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

Ala Ala Phe

<210> 20
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 片段, 人alpha-CGRP的变体

<400> 20

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

Glu Ala Phe

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

<400> 21

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

Met Ala Phe

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

[0009]

<400> 22

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

Gln Ala Phe

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

<400> 23

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

Lys Ala Ala

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

<400> 24

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

<210> 25
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 alpha-CGRP片段

<400> 25

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

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

<400> 26

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

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

[0010] <220>
<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

<400> 27

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

<210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

<400> 28

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

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

<400> 29

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

<210> 30

<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

<400> 30

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

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

<400> 31

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

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

<400> 32

[0011] Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Ala Ser Lys Ala Phe
1 5 10

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

<400> 33

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

<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 片段, 人 alpha-CGRP的变体

<400> 34

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

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人 alpha-CGRP片段

<400> 35

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

<210> 36

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 alpha-CGRP片段

<400> 36

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

Lys Ala Phe

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 alpha-CGRP片段

<400> 37

[0012] Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser
1 5 10 15

Lys Ala

<210> 38

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 alpha-CGRP片段

<400> 38

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

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

Gly Ser Lys Ala
35

<210> 39

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 alpha-CGRP片段

<400> 39

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

Ser Arg Ser

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 alpha-CGRP片段

<400> 40

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

<210> 41
<211> 37
<212> PRT
<213> 大鼠

<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

[0013]

Gly Ser Glu Ala Phe
35

<210> 42
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠alpha-CGRP片段

<400> 42

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

Glu Ala Phe

<210> 43
<211> 37
<212> PRT
<213> 人

<400> 43

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

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

Gly Ser Lys Ala Phe
35

<210> 44
<211> 37
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 44

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

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

Gly Ser Lys Ala Phe
35

<210> 45
<211> 32
<212> PRT
<213> 人

<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

[0014]

<210> 46
<211> 37
<212> PRT
<213> 人

<400> 46

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

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

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 47
<211> 52
<212> PRT
<213> 人

<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

[0015]

Pro Gln Gly Tyr
50

Fab	K _D (nM) 1-37 (WT)	K _D (nM) 19-37 ^a	K _D (nM) 25-37 ^a	K _D (突变体/亲体)											
				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	4	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			

图1

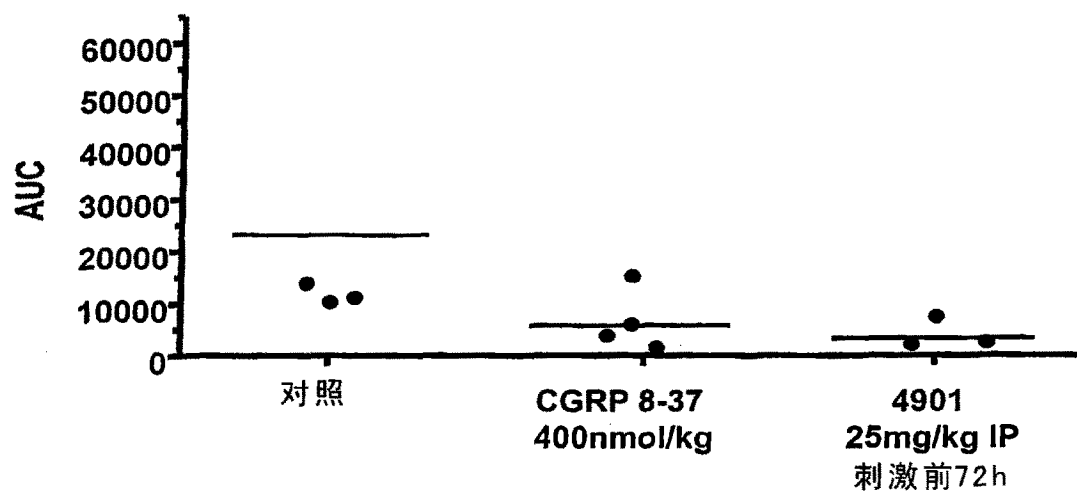


图2A

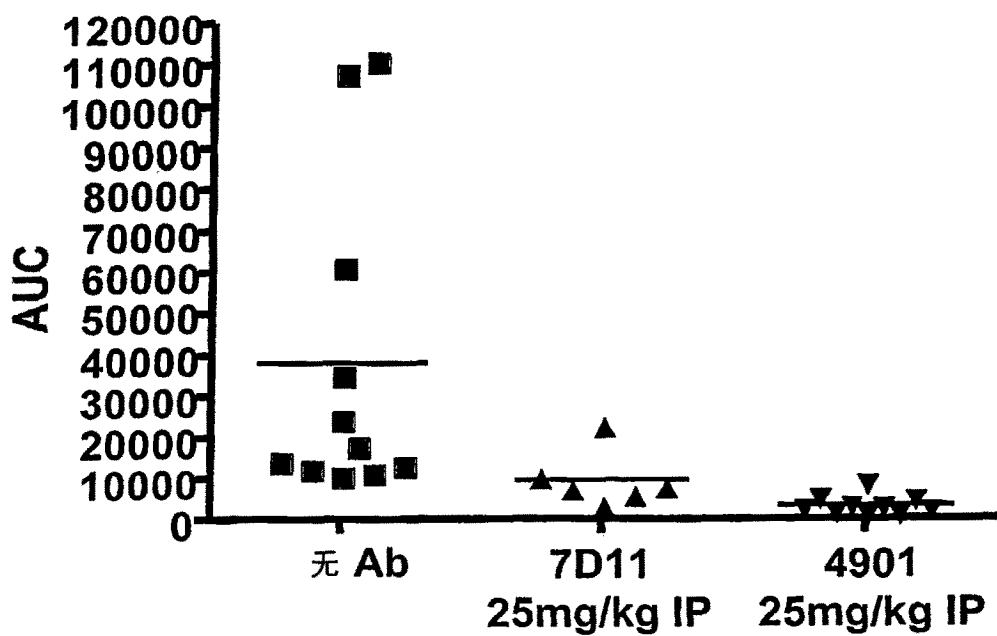


图2B

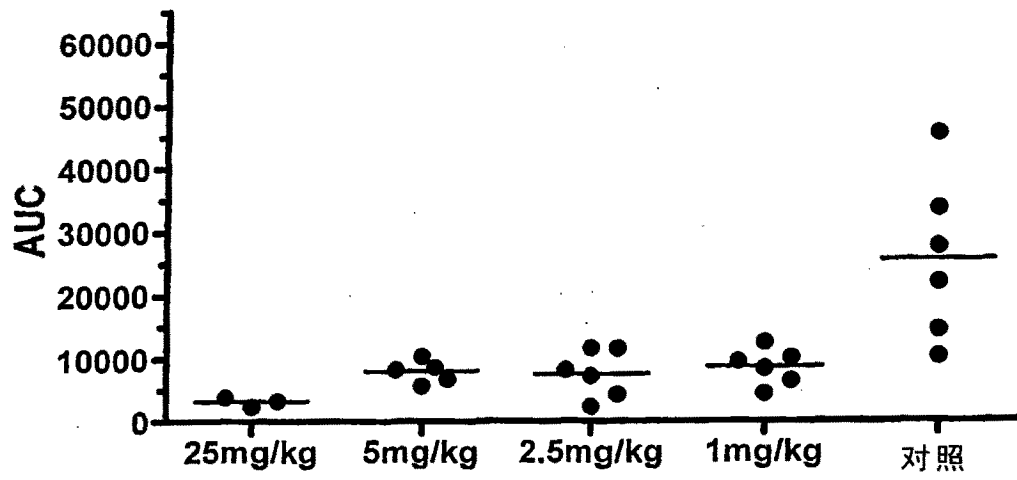


图3

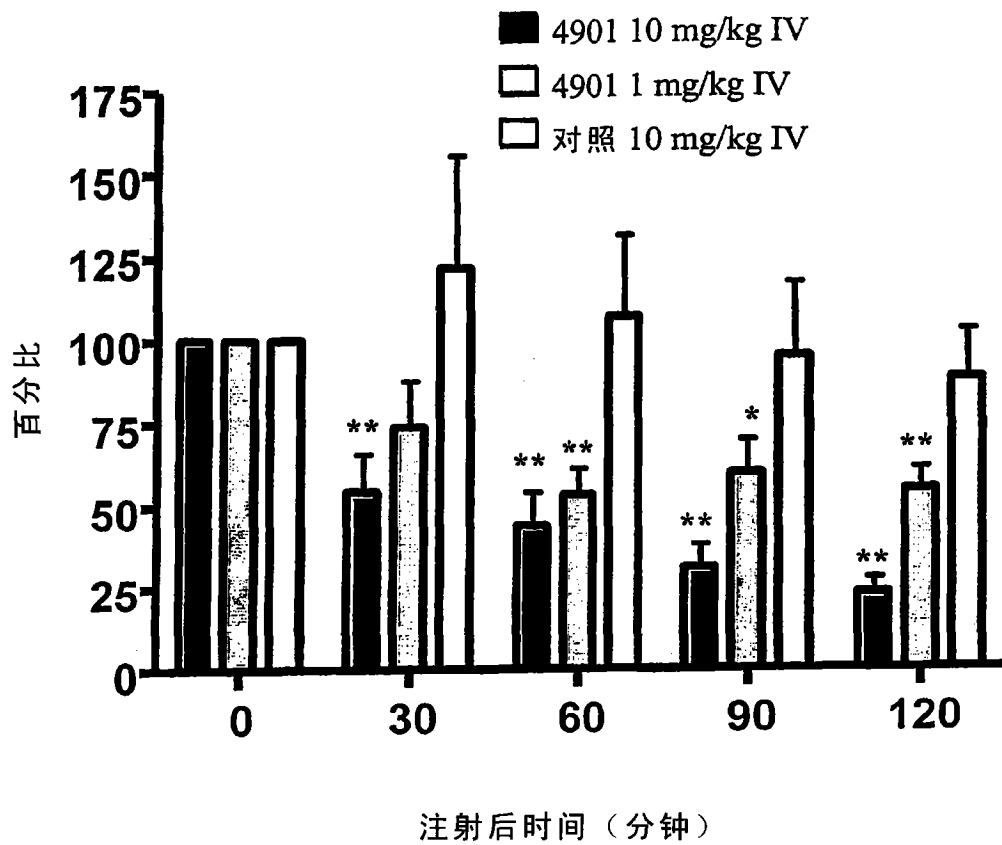


图4A

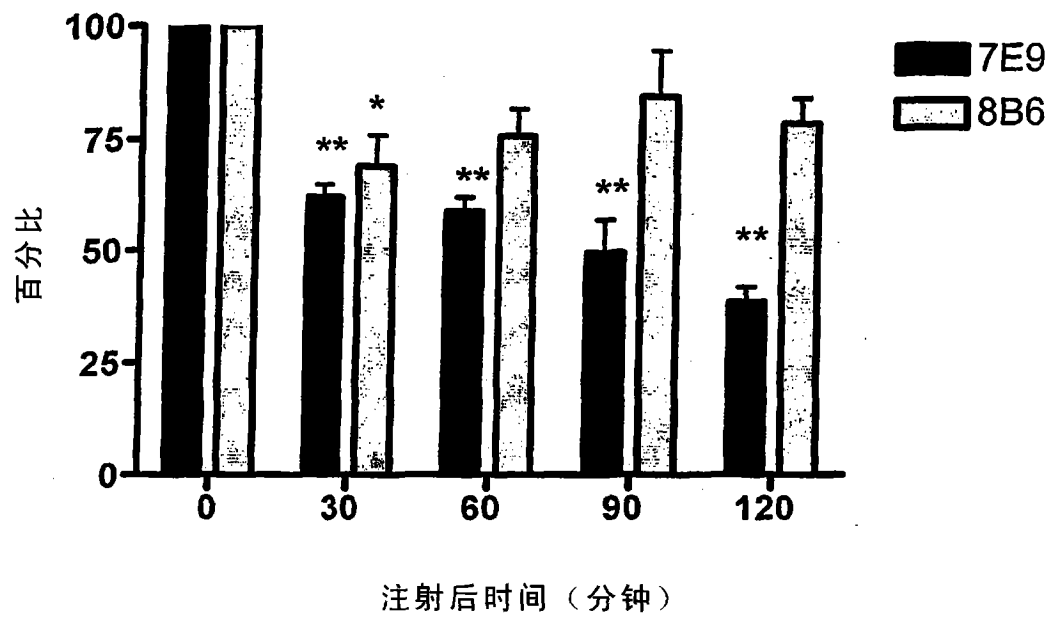


图4B

黑体=Kabat CDR
下划线=Chothia CDR

G1 重链

```

1         5         10        15        20        25        H1        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

31        35        40        45        50        55        H2        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

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

121 122
S S

```

G1 轻链

```

1         5         10        15        20        25        L1        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

31        35        40        45        50        55        L2        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

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        L3        95        100       105       107
S Y N Y P Y T F G Q G T K L E I K

```

图5

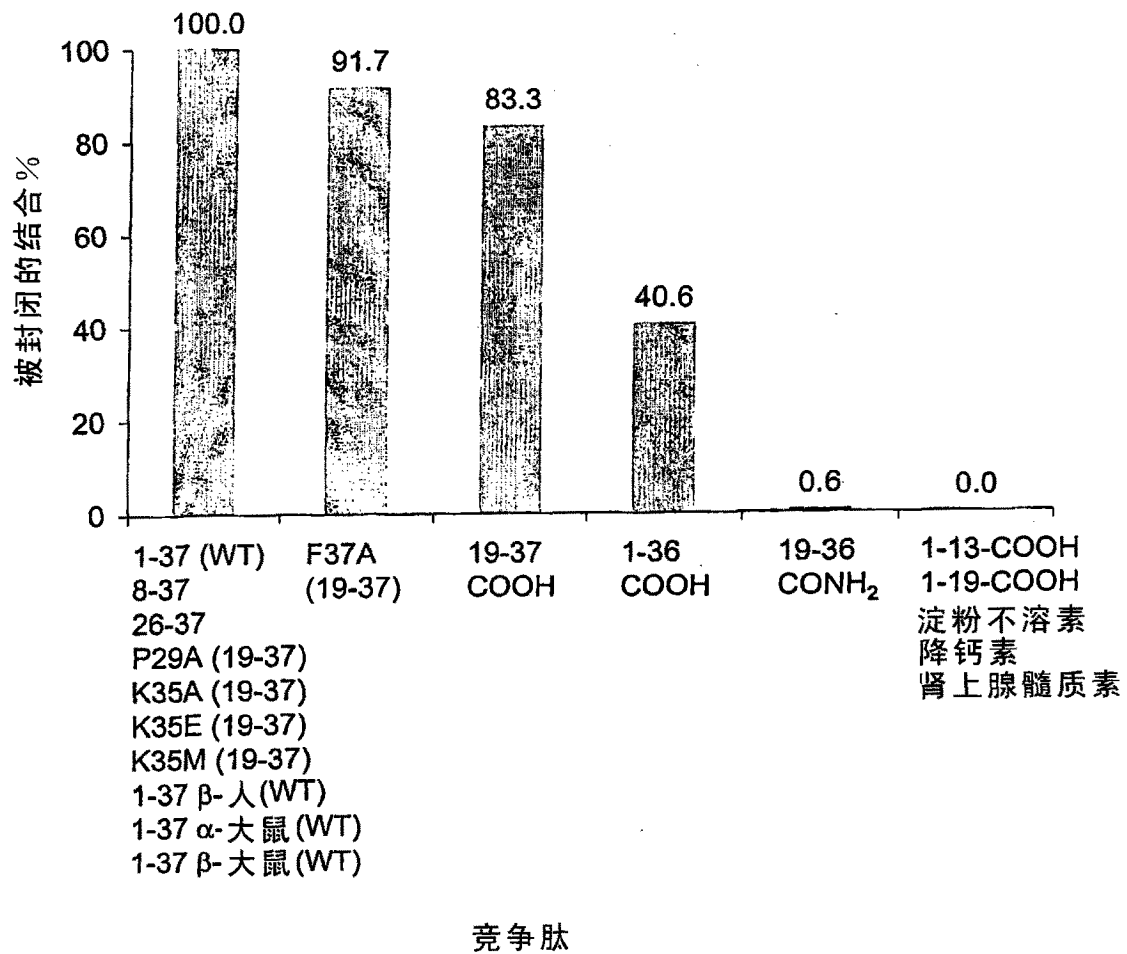


图6

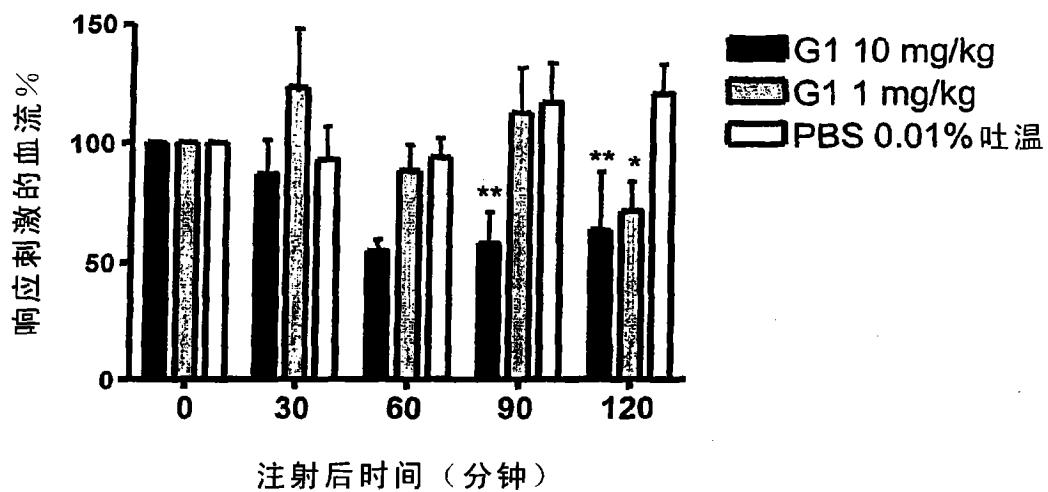


图7

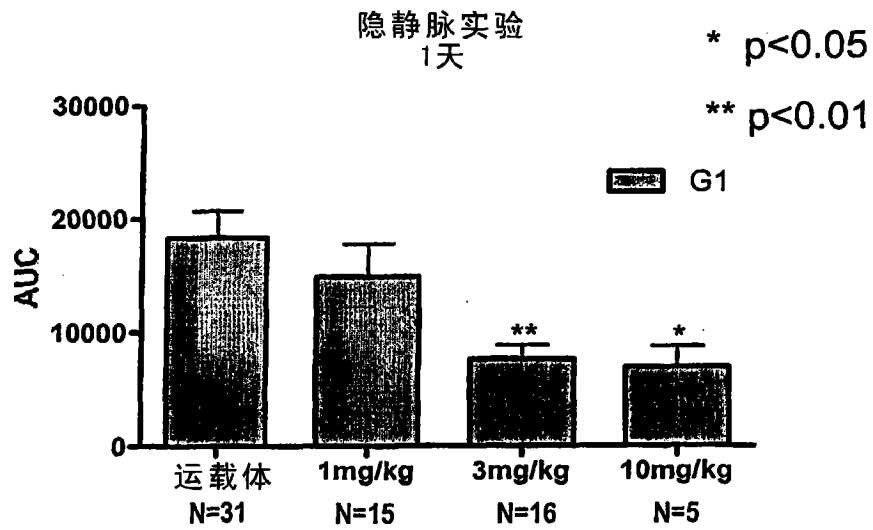


图8A

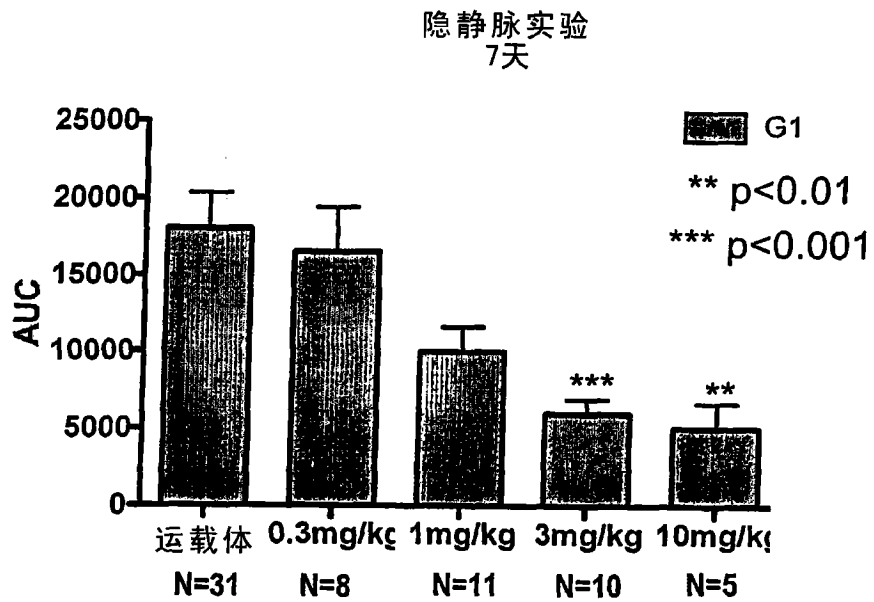


图8B

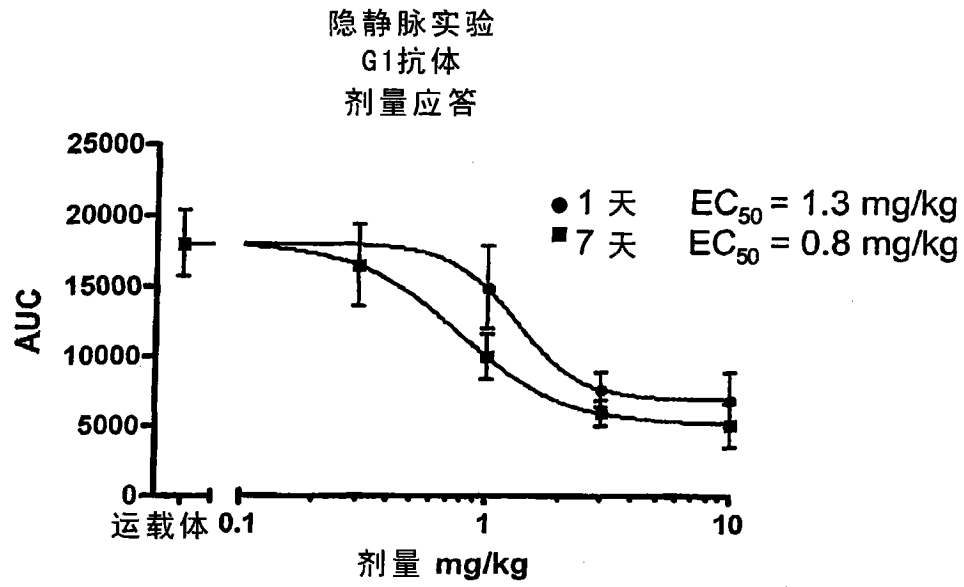


图8C

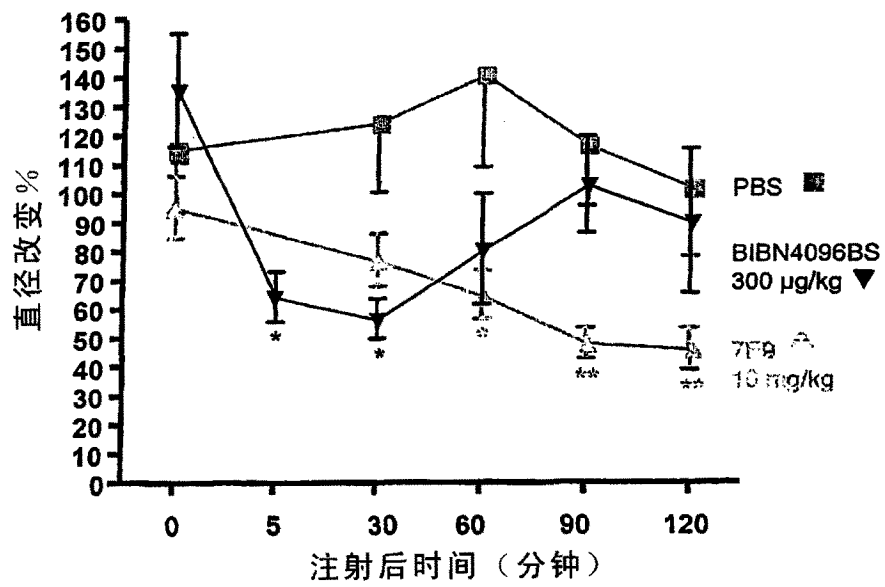


图9

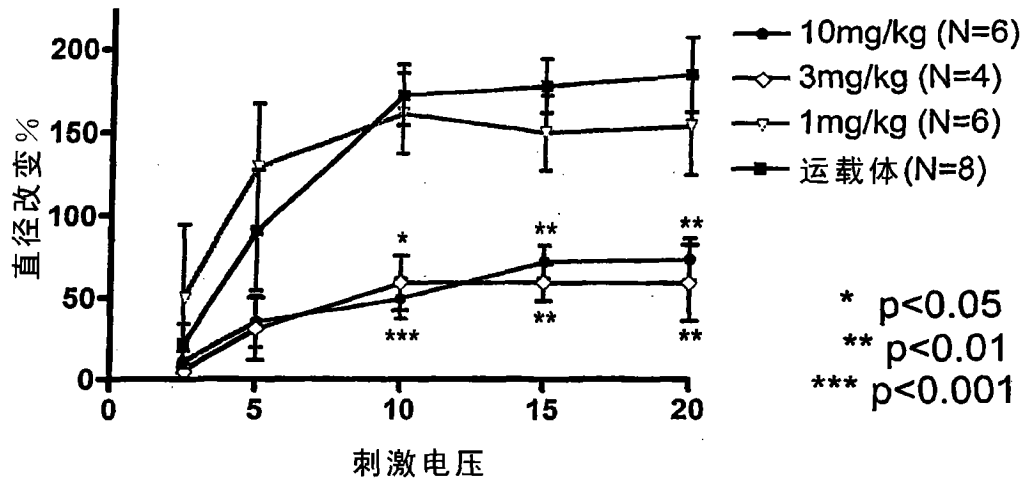


图10

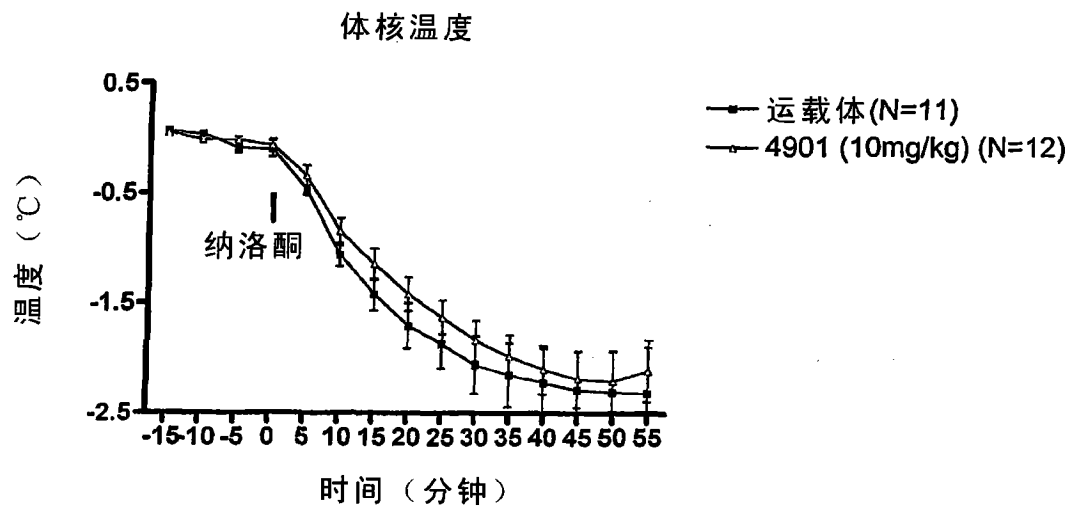


图11A

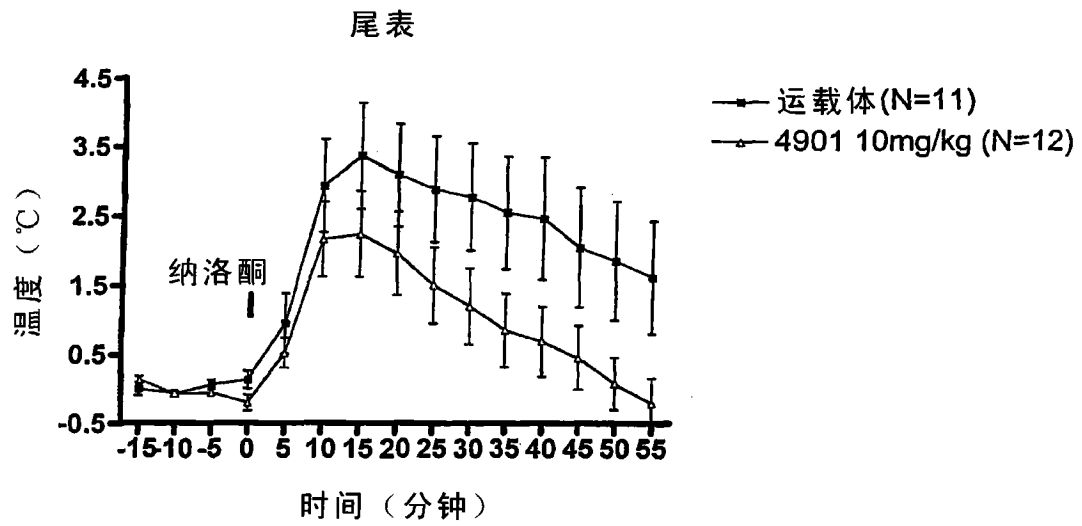


图11B