

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202390567 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.10.31

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2015.03.20

(54) АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ ПЕПТИДА, КОДИРУЕМОГО ГЕНОМ КАЛЬЦИТОНИНА, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/968,897; 62/083,809; 62/119,778  
(32) 2014.03.21; 2014.11.24; 2015.02.23  
(33) US  
(62) 201691787; 2015.03.20  
(71) Заявитель:  
ТЕВА ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ  
ИНТЕРНЭШНЛ ГМБХ (СН)

(72) Изобретатель:  
Бигал Марсело, Уолтер Сара, Стерн  
Генри, Чан Майкл (US)  
(74) Представитель:  
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение описывает способы предотвращения или лечения расстройства, ассоциированного с CGRP, такого как вазомоторные симптомы и/или головные боли (например, мигрень, кластерная головная боль и тензионная головная боль) путем введения антагонистического антитела против CGRP. Также предусматриваются композиции для применения в раскрытых способах. Также описаны антагонистическое антитело G1 и антитела, полученные из G1, направленные против CGRP.

Fab	K <sub>d</sub> (nM)	K <sub>d</sub> (nM)	K <sub>d</sub> (nM)	K <sub>d</sub> (мутант/исходный)										
				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	2827	
10A8	2.1	2.4±1.4	1.0±0.2	1.0	1.0	9	4	4	11	36	32	13	2153	
7D11	4.4	10±7	3.4±0.4	1.1	1.0	7	4	5	5	96	18	1.4	430	
6H2	9.3	7.8±0.2	8.5±0.5	0.9	1.0	1.0	0.8	4	11	14	0.5	1.0		
4901	60.5	52±12	296±115	0.8	0.8	0.2	0.2	0.3	0.9	1.3	0.8	0.3		
14E10	79.7	91±3	117±60.7	0.8	0.8	11	3	18	2	1	3	0.4		
9B8	84.7	76±20	96±28	0.8	0.8	0.6	0.6	0.7	0.6	1.3	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	6		
G1S	209.9	207±26	378±22	0.8	0.7	0.5	0.4	0.6	0.5	1.1	1.1	5		
1CS	296.4	223±51	426±173	0.8	0.8	0.6	0.4	0.6	0.6	1.1	1.1	5		

202390567 A1

202390567 A1



сегодняшний день, наиболее эффективными видами терапии приливов являются гормональные методы лечения, включая эстрогены и/или некоторые прогестины. Гормональные методы лечения могут быть эффективными для облегчения приливов, но не являются пригодными для всех женщин. Наблюдаемые психологические и эмоциональные симптомы, такие как нервозность, усталость, раздражительность, бессонница, депрессия, потеря памяти, головная боль, тревога, нервозность или неспособность концентрироваться считаются вызванными потерей сна после приливов крови и ночной потливости (Kramer et al., в: Murphy et al., 3<sup>sup</sup>.rd Int'l Symposium on Recent Advances in Urological Cancer diagnosis and Treatment-Proceedings, Paris, France: SCI: 3-7 (1992)).

Мужчины также испытывают приливы крови после отмены стероидного гормона (андрогена). Это наблюдается в случае возрастного снижения андрогенов (Katovich, et al., Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine, 1990, 193(2): 129-35), а также в крайних случаях выключения эндокринной функции, ассоциированных с лечением рака простаты (Berendsen, et al., European Journal of Pharmacology, 2001, 419(1): 47-54). Треть таких пациентов испытывает постоянные и частые симптомы, достаточно тяжелые для того, чтобы вызывать значительный дискомфорт и неудобства.

CGRP является сильным вазодилататором, который задействован в патологии других вазомоторных симптомов, таких как формы сосудистой головной боли, включая мигрени (с аурой или без) и кластерная головная боль. Durham, N. Engl. J. Med. 350:1073-1075, 2004. Уровни CGRP в сыворотке в наружной яремной вене повышены у пациентов во время приступов мигрени. Goadsby et al., Ann. Neurol. 28:183-7, 1990. Внутривенное введение человеческого  $\alpha$ -CGRP индуцировало головную боль и мигрень у пациентов, страдающих мигренью без ауры, позволяя предположить, что CGRP играет причинную роль при мигрени. Lassen et al., Cephalalgia 22:54-61, 2002.

Возможное участие CGRP в мигрени послужило основой для разработки и тестирования ряда соединений, которые ингибируют высвобождение CGRP (например, суматриптан), антагонизируют рецептор CGRP (например, дипептидное производное BIBN4096BS (Boehringer Ingelheim); CGRP(8-37)), или взаимодействуют с одним или несколькими ассоциированными с рецептором белками, такими как мембранный белок рецепторной активности (RAMP) или белковый компонент рецептора (RCP), которые

оба влияют на связывание CGRP с его рецепторами. Brain, S. et al., Trends in Pharmacological Sciences 23:51-53, 2002. Субтипы альфа-2 адренорецептора и рецепторы аденозина A1 также контролируют (ингибируют) высвобождение CGRP и возбуждение тройничного нерва (Goadsby et al., Brain 125:1392-401, 2002). Агонист рецептора аденозина A1 GR79236 (метрафадил), который, как было продемонстрировано, ингибирует нейрогенную вазодилатацию и тригеминальную ноцицепцию у людей, может также обладать противомигреновой активностью (Arulmani et al., Cephalalgia 25:1082-1090, 2005; Giffin et al., Cephalalgia 23:287-292, 2003.)

10       Этой теории противоречит наблюдение, что лечение соединениями, ингибирующими исключительно нейрогенное воспаление (например, антагонистами рецептора такикина NK1) или возбуждение тройничного нерва (например, агонистами рецептора 5HT<sub>1D</sub>), как было продемонстрировано, является относительно неэффективным в качестве средства купирования приступов мигрени, что заставило  
15       некоторых исследователей высказывать сомнения в том, что ингибирование высвобождения CGRP является первичным механизмом действия эффективных противомигреновых терапий. Arulmani et al., Eur. J. Pharmacol. 500:315-330, 2004.

Мигрень представляет собой комплексное распространенное неврологическое состояние, характеризующееся тяжелыми эпизодическими приступами головной боли и ассоциированными признаками, которые могут включать тошноту, рвоту, чувствительность к свету, звукам или движению. У некоторых пациентов, головной боли предшествует, или она сопровождается аурой. Головная боль может быть тяжелой, и могут также быть односторонней у определенных пациентов.

Приступы мигрени оказывают разрушительное воздействие на повседневную жизнь. В США и Западной Европе общее количество людей, страдающих от мигрени, составляет 11 % от населения в целом (6 % мужчин; 15-18 % женщин). Кроме того, медианная частота приступов у индивидуума составляет 1,5/месяц. Хотя существует ряд способов лечения, предназначенных для смягчения или ослабления симптомов, пациентам, испытывающим более 3-4 приступов мигрени в месяц, рекомендуется  
25       превентивная терапия. Goadsby et al. New Engl. J. Med. 346(4): 257-275, 2002.

30       Различные способы фармакологического вмешательства, которые использовались для лечения мигрени, и разнообразие откликов у пациентов свидетельствуют о многообразном характере этого расстройства. Таким образом, такие

относительно неселективные лекарственные средства, как алкалоиды спорыньи (например, эрготамин, дигидроэрготамин, метисергид), проявляющие серотонинергическую, а также адренергическую, норадренергическую и допаминергическую активность, использовались на протяжении более восьмидесяти лет для лечения мигрени. Другие способы лечения включают опиаты (например, оксикодон) и  $\beta$ -адренергические антагонисты (например, пропранолол). Некоторые пациенты, обычно, с более мягкими симптомами, способны контролировать свои симптомы с помощью отпускаемых без рецепта лекарств, таких как один или несколько нестероидных противовоспалительных агентов (NSAIDs), таких как комбинация аспирина, ацетаминофена и кофеина (например, Excedrin® Migraine (экседрин-мигрень)).

В последнее время, некоторых пациентов с мигренью лечили топираматом, противосудорожным средством, которое блокирует потенциал-зависимые натриевые каналы, и определенные глутаматные рецепторы (AMPA-каинат), потенцирует активность рецептора GABA-A, и блокирует карбоангидразу. Относительно недавний успех агонистов рецептора серотонина 5HT-1B/1D и/или 5HT-1a, таких как суматриптан, у некоторых пациентов подтолкнул исследователей к предположению о серотонинергической этиологии расстройства. К сожалению, хотя некоторые пациенты хорошо откликнулись на этот способ лечения, другие были относительно невосприимчивыми к нему.

Было предположено, что в основе расстройства лежит дисфункция ионного канала в аминергических ядрах ствола мозга, однако точная патофизиология мигрени изучена недостаточно. Было показано, что одна из форм мигрени, семейная гемиплегическая мигрень, ассоциирована с миссенс-мутациями в  $\alpha 1$ -субъединице потенциал-управляемых кальциевых каналах P/Q-типа, и считается вероятным, что другие мутации ионных каналов также будут обнаружены в других популяциях пациентов. Хотя дилатация кровеносных сосудов ассоциирована с и усиливает болевые симптомы мигрени, такие нервно-сосудистые события в настоящее время считаются результатом, а не причиной состояния. В общем, объединяющим признаком мигрени считается дисфункция путей ствола мозга, модулирующих сенсорный вход. Goadsby, P.J. et al., New Engl. J. Med. 346(4): 257-275, 2002.

Краткое описание сущности изобретения

В некоторых аспектах, изобретение, раскрытое в данном документе, касается антагонистических антител против CGRP и способов использования антагонистических антител против CGRP для лечения или профилактики вазомоторных симптомов. Примеры вазомоторных симптомов приведены в данном документе, такие как прилив крови. В некоторых случаях, антагонистические антитела против CGRP используются для лечения или профилактики головной боли, такой как мигрень с аурой или без нее, гемиплегическая мигрень, кластерные головные боли, мигренозная невралгия, хронические головные боли, головные боли напряжения, и головные боли, вызванные другими медицинскими состояниями (такими как инфекция или повышенное внутричерепное давление вследствие опухоли).

В одном аспекте, настоящее изобретение предусматривает способ лечения или профилактики по меньшей мере одного вазомоторного симптома у osoby, включающий введение особе эффективного количества антагонистического антитела против CGRP.

В одном аспекте, настоящее изобретение предусматривает способ лечения или профилактики головной боли (например, мигрени и кластерной головной боли) у osoby, включающий введение особе эффективного количества антагонистического антитела против CGRP.

В другом аспекте, изобретение предусматривает способ облегчения, контроля, снижения частоты, или задержки развития или прогрессирования головной боли (например, мигрени и кластерной головной боли) у osoby, включающий введение особе эффективного количества антагонистического антитела против CGRP.

В одном аспекте, изобретение предусматривает способ лечения или снижения частоты по меньшей мере одного вазомоторного симптома и/или головной боли у субъекта. В одном варианте реализации, способ включает введение субъекту в течение множества дней некоторого количества моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP, причем количество, вводимое в каждый из множества дней, составляет менее 1000 мг. В одном варианте реализации, способ включает введение субъекту в течение множества дней некоторого количества моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP, причем количество, вводимое в каждый из множества дней, имеет значение в диапазоне 100-2000 мг. В некоторых вариантах реализации, головная боль

представляет собой мигрень (например, хроническую мигрень или эпизодическую мигрень). В некоторых вариантах реализации, два из множества дней разделены интервалом более чем семь дней. В некоторых вариантах реализации, частота головной боли снижается на по меньшей мере семь дней после однократного введения. В некоторых вариантах реализации, количество моноклонального антитела, вводимого в первый день, отличается от (например, превышает) количество моноклонального антитела, вводимого во второй день. В некоторых вариантах реализации, субъекту вводят менее чем 3 дозы в месяц. В некоторых вариантах реализации, введение представляет собой подкожное введение. В некоторых вариантах реализации, введение представляет собой внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации, введение включает использование предварительно наполненного шприца, содержащего определенное количество моноклонального антитела. В некоторых вариантах реализации, композицию моноклонального антитела готовят в концентрации 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл. В некоторых вариантах реализации, количество моноклонального антитела составляет менее 1000 мг. В некоторых вариантах реализации, месячное количество часов головной боли, испытываемой субъектом, снижается после указанного введения на 40 или более часов (например 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, или более) по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения. Месячное количество часов головной боли могут быть уменьшено более чем на 60 часов. В некоторых вариантах реализации, месячное количество часов головной боли, испытываемой субъектом, после указанного введения, снижается на 25 % или больше (например, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, или больше) по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения. Месячное количество часов головной боли могут быть уменьшено на 40 % или больше. В некоторых вариантах реализации, месячное количество дней головной боли, испытываемой субъектом, снижается после указанного введения на 3 или больше дней (например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше дней) по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения. В некоторых вариантах реализации, способ дополнительно включает введение субъекту второго агента одновременно или последовательно с моноклональным антителом. Второй агент может быть любым из агонистов 5-НТ1, триптанов, алкалоидов спорыньи и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. В некоторых вариантах реализации, второй агент представляет

собой агент, принимаемый субъектом профилактически. В некоторых вариантах реализации, месячное применение второго агента субъектом снижается на по меньшей мере 15 % после введения моноклонального антитела. В некоторых вариантах реализации, второй агент представляет собой триптан. В некоторых вариантах реализации, субъект является человеком. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным моноклональным антителом. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело включает (а) антитело, имеющее CDR H1, как представлено в SEQ ID NO: 3; CDR H2, как представлено в SEQ ID NO: 4; CDR H3, как представлено в SEQ ID NO: 5; CDR L1, как представлено в SEQ ID NO: 6; CDR L2, как представлено в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, как представлено в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела в соответствии с (а), как показано в Таблице 6.

В одном аспекте, изобретение предусматривает способ уменьшения величины месячного количества часов головной боли, испытываемой субъектом. В одном варианте реализации, способ включает введение субъекту количества моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, где количество моноклонального антитела эффективно снижает величину месячного количества часов головной боли на по меньшей мере 20 (например 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или больше часов головной боли) после разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, величина месячного количества часов головной боли снижается на по меньшей мере около 50 часов. В одном варианте реализации, способ включает введение субъекту количества моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, где количество моноклонального антитела эффективно снижает величину месячного количества часов головной боли на по меньшей мере 15 % (например 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, или больше) после разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, величина месячного количества часов головной боли снижается на по меньшей мере около 30 %. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело представляет собой антагонистическое антитело против CGRP. В некоторых вариантах реализации, количество моноклонального антитела составляет менее 1000 мг. В некоторых вариантах реализации, субъекту вводят меньше чем 3 дозы в месяц. В некоторых вариантах реализации, введение представляет собой подкожное или внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации, композицию моноклонального антитела готовят в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В

некоторых вариантах реализации, (в которых) моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл. В некоторых вариантах реализации, субъект является человеком. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело включает (а) антитело, имеющее CDR H1, как представлено в SEQ ID NO: 3; CDR H2, как представлено в SEQ ID NO: 4; CDR H3, как представлено в SEQ ID NO: 5; CDR L1, как представлено в SEQ ID NO: 6; CDR L2, как представлено в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, как представлено в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела в соответствии с (a), как показано в Таблице 6.

10 В одном аспекте, изобретение предусматривает способ уменьшения величины месячного количества дней головной боли, испытываемой субъектом. В одном варианте реализации, способ включает введение субъекту количества моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, где количество моноклонального антитела эффективно снижает величину месячного количества дней головной боли на по меньшей мере 3 (например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше дней головной боли) после разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, величина месячного количества дней головной боли снижается на по меньшей мере около 6 дней головной боли. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело представляет собой антагонистическое антитело против CGRP. В некоторых вариантах реализации, количество моноклонального антитела составляет менее 1000 мг. В некоторых вариантах реализации, субъекту вводят меньше чем 3 дозы в месяц. В некоторых вариантах реализации, введение представляет собой подкожное или внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации, композицию моноклонального антитела готовят в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации, (в которых) моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл. В некоторых вариантах реализации, субъект является человеком. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело включает (а) антитело, имеющее CDR H1, как представлено в SEQ ID NO: 3; CDR H2, как представлено в SEQ ID NO: 4; CDR H3, как представлено в SEQ ID NO: 5; CDR L1, как представлено в SEQ ID NO: 6; CDR L2, как представлено в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, как представлено в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела в соответствии с (a), как показано в Таблице 6.

В одном аспекте, изобретение предусматривает способ уменьшения использования субъектом лекарственного препарата против головной боли, включающий введение субъекту моноклонального антитела (например, антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP, где количество моноклонального антитела эффективно снижает месячное применение субъектом лекарственного препарата против головной боли на по меньшей мере 15 % (например 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, или больше). В некоторых вариантах реализации, лекарственный препарат против головной боли выбирают из группы, состоящей из агонистов 5-HT<sub>1</sub>, триптанов, опиатов, β-адренергических антагонистов, алкалоидов спорыньи, и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств (NSAIDs). В некоторых вариантах реализации, лекарственным препаратом против головной боли является триптан. В некоторых вариантах реализации, количество моноклонального антитела составляет менее 1000 мг. В некоторых вариантах реализации, субъекту вводят меньше чем 3 дозы в месяц. В некоторых вариантах реализации, введение представляет собой подкожное или внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации, композицию моноклонального антитела готовят в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации, (в которых) моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл. В некоторых вариантах реализации, субъект является человеком. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело включает (а) антитело, имеющее CDR H1, как представлено в SEQ ID NO: 3; CDR H2, как представлено в SEQ ID NO: 4; CDR H3, как представлено в SEQ ID NO: 5; CDR L1, как представлено в SEQ ID NO: 6; CDR L2, как представлено в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, как представлено в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела в соответствии с (а), как показано в Таблице 6.

В одном аспекте, изобретение предусматривает способ лечения или уменьшения частоты головной боли (например, мигрени) у субъекта, включающий введение субъекту разовой дозы моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) в количестве, которое модулирует путь CGRP, причем количество моноклонального антитела имеет значение в диапазоне 100-2000 мг.

В дополнительном варианте реализации, изобретение предусматривает способы облегчения, контроля, снижения частоты, или задержки развития или

прогрессирования головной боли (например, мигрени и кластерной головной боли) у особы, включающий введение особе эффективного количества антагонистического антитела против CGRP в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным агентом, пригодным для лечения головной боли. Такие дополнительные агенты  
5 включают 5-HT<sub>1</sub>-подобные агонисты (и агонисты, воздействующие на другие сайты 5-HT<sub>1</sub>), и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAIDs).

Примеры агонистов 5-HT<sub>1</sub>, которые могут быть использованы в комбинации с антителом против CGRP, включают класс соединений, известных как триптаны, такие как суматриптан, золмитриптан, наратриптан, ризатриптан, елетриптан, алмотриптан, и  
10 фроватриптан. Известно, что алкалоиды спорыньи и родственные соединения также обладают агонистической активностью к 5-HT и использовались для лечения головной боли, такой как мигрень. Такие соединения включают, в частности, эрготамин тартрат, эргоновин малеат, и эрголоид мезилаты (например, дигидроэргокорнин, дигидроэргокристин, дигидроэргокриптин и дигидроэрготамин мезилат (DHE 45)).

Примеры NSAIDs, которые могут быть использованы в комбинации с антителом против CGRP включают аспирин, диклофенак, дифлусинал, этодолак, фенбуфен, фенопрофен, флуфенисад, флурбипрофен, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, меклофенамовую кислоту, мефенамовую кислоту, набуметон, напроксен, оксапрозин, фенилбутазон, пироксикам, сулиндак, толметин или  
15 зомепаирак, ингибиторы циклооксигеназы-2 (COX-2), целекоксиб; рофекоксиб; мелоксикам; JTE-522; L-745,337; NS398;, или их фармацевтически приемлемые соли.

В другом аспекте, изобретение предусматривает способ облегчения, контроля, снижения частоты, или задержки развития или прогрессирования приливов крови у особы, включающий введение особе эффективного количества антагонистического антитела против CGRP.  
25

В другом аспекте, изобретение предусматривает способы облегчения, контроля, снижения частоты, или задержки развития или прогрессирования приливов крови у особы, включающий введение особе эффективного количества антагонистического антитела против CGRP в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным агентом, пригодным для лечения приливов крови. Такие дополнительные агенты  
30 включают, без ограничений, гормональные методы лечения, включая эстрогены и/или прогестины.

В одном варианте реализации, антагонистическое антитело против CGRP, используемое в любом из описанных выше способов, представляет собой любое из антител, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP 5 распознает человеческий CGRP. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP связывается с обоими из человеческих  $\alpha$ -CGRP и  $\beta$ -CGRP. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP связывается с человеческим и крысиным CGRP. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP связывает C-концевой 10 фрагмент, содержащий аминокислоты 25-37 CGRP. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP связывает C-концевой эпитоп в пределах аминокислот 25-37 CGRP.

В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах реализации, 15 антагонистическое антитело против CGRP является гуманизированным. В некоторых вариантах реализации, антитело является человеческим. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP представляет собой антитело G1 (как описано в данном документе). В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP включает один или несколько CDR 20 (гипервариабельных участков) например, один, два, три, четыре, пять или, в некоторых вариантах реализации, все шесть CDR) антитела G1 или вариантов G1, представленных в Таблице 6. В других вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP содержит аминокислотную последовательность вариабельного участка тяжелой цепи, представленную на Фигуре 5 (SEQ ID NO: 1), и аминокислотную 25 последовательность вариабельного участка легкой цепи, представленную на Фигуре 5 (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах реализации, антитело содержит модифицированную константную область, такую как константную область, которая является иммунологически инертной (включая частично иммунологически инертную), 30 например, не инициирует медируемый комплементом лизис, не стимулирует опосредованную антителами клеточную цитотоксичность (ADCC), не активирует микроглию, или обладает сниженной одной или несколькими из указанных активностей. В некоторых вариантах реализации, константная область является

модифицированной, как описано в Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; заявке РСТ № РСТ/GB99/01441; и/или патентной заявке Великобритании № 9809951.8. В других вариантах реализации, антитело содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG2, содержащую следующие мутации: A330P331 на S330S331 (5 нумерация аминокислот в соответствии с последовательностью IgG2 дикого типа). Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624. В некоторых вариантах реализации, константная область тяжелой цепи антитела представляет собой тяжелую цепь человеческого IgG1 с любыми из следующих мутаций: 1) A327A330P331 на G327S330S331; 2) E233L234L235G236 (SEQ ID NO: 48) на P233V234A235 с делецией G236; 3) 10 E233L234L235 на P233V234A235; 4) E233L234L235G236A327A330P331 (SEQ ID NO: 49) на P233V234A235G327S330S331 (SEQ ID NO: 50) с делецией G236; 5) E233L234L235A327A330P331 (SEQ ID NO: 51) на P233V234A235G327S330S331 (SEQ ID NO: 50); и 6) N297 на A297 или любую другую аминокислоту кроме N. В некоторых вариантах реализации, константная область тяжелой цепи антитела представляет собой 15 тяжелую цепь человеческого IgG4 с любыми из следующих мутаций: E233F234L235G236 (SEQ ID NO: 52) на P233V234A235 с делецией G236; E233F234L235 на P233V234A235; и S228L235 на P228E235.

В других вариантах реализации, константная область агликозилирована для N-связанного гликозилирования. В некоторых вариантах реализации, константная 20 область агликозилирована для N-связанного гликозилирования путем мутации остатка присоединения олигосахарида (такого как Asn297) и/или фланкирующих остатков, являющихся частью последовательности распознавания N-гликозилирования в константной области. В некоторых вариантах реализации, константная область агликозилирована для N-связанного гликозилирования. Константная область может 25 быть агликозилирована для N-связанного гликозилирования ферментативно или путем экспрессии в дефицитной по гликозилированию клетке-хозяине.

Аффинность связывания ( $K_D$ ) антагонистического антитела против CGRP с CGRP (такого как человеческий  $\alpha$ -CGRP при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса при соответствующей температуре, такой как 25 или 37 °C) 30 может составлять от около 0,02 до около 200 нМ. В некоторых вариантах реализации, аффинность связывания имеет любое значение из около 200 нМ, около 100 нМ, около 50 нМ, около 10 нМ, около 1 нМ, около 500 пМ, около 100 пМ, около 60 пМ, около 50 пМ, около 20 пМ, около 15 пМ, около 10 пМ, около 5 пМ, или около 2 пМ. В

некоторых вариантах реализации, аффинность связывания имеет значение меньше любой величины из около 250 нМ, около 200 нМ, около 100 нМ, около 50 нМ, около 10 нМ, около 1 нМ, около 500 пМ, около 100 пМ, или около 50 пМ. В некоторых вариантах реализации, аффинность связывания имеет значение меньше около 50 нМ.

5 Антагонистическое антитело против CGRP может быть введено до, во время и/или после головной боли. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP вводят перед приступом головной боли (например, мигрени и кластерной головной боли). Введение антагонистического антитела против CGRP может осуществляться любыми средствами, известными специалистам, включая:  
10 орально, внутривенно, подкожно, интраартериально, внутримышечно, интраназально (например, с ингаляцией или без нее), интракардиально, интраспинально, интраторакально, интраперитонеально, интравентрикулярно, сублингвально, трансдермально, и/или путем ингаляции. Введение может быть системным, например, внутривенным, или локализованным.

15 В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP может быть введено в сочетании с другим агентом, таким как другой агент для лечения головной боли.

В другом аспекте, изобретение предусматривает использование антагонистического антитела против CGRP для производства лекарственного средства,  
20 предназначенного для использования в любом из способов, описанных в данном документе, например, для лечения или профилактики головной боли.

В другом аспекте, изобретение предусматривает фармацевтическую композицию для предотвращения или лечения головной боли (например, мигрени и кластерной головной боли), содержащую эффективное количество антагонистического  
25 антитела против CGRP, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

В другом аспекте, изобретение предусматривает набор для использования в любом из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах реализации, набор включает контейнер, композицию, содержащую антагонистическое  
30 антитело против CGRP, описанное в данном документе, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, и инструкции по использованию композиции в любом из способов, описанных в данном документе.

Настоящее изобретение также предусматривает антагонистические антитела против CGRP и полипептиды, полученные из антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6. Соответственно, в одном аспекте, изобретение предусматривает антитело G1 (взаимозаменяемо обозначаемое "G1"), которое продуцируется экспрессионными векторами, имеющими номера доступа ATCC PTA-6866 и PTA-6867. Например, в одном варианте реализации предусматривается антитело, содержащее тяжелую цепь, продуцируемую экспрессионным вектором с номером доступа ATCC PTA-6867. В дополнительном варианте реализации предусматривается антитело, содержащее легкую цепь, продуцируемую экспрессионным вектором с номером доступа ATCC PTA-6866. Аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой цепи и легкой цепи G1 представлены на Фигуре 5. Участки, определяющие комплементарность (гипервариабельные участки, CDR) антитела G1 (включая CDR по системам нумерации Chothia и Kabat) также представлены на Фигуре 5. Следует понимать, что ссылка на любую часть или целую область G1 охватывает последовательности, продуцируемые экспрессионными векторами, имеющими номера доступа ATCC PTA-6866 и PTA-6867, и/или последовательности, изображенные на Фигуре 5. В некоторых вариантах реализации, изобретение также предусматривает варианты антитела G1 с аминокислотными последовательностями, представленными в Таблице 6.

В одном аспекте, изобретение предусматривает антитело, содержащее домен  $V_H$ , который на по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 86 %, по меньшей мере 87 %, по меньшей мере 88 %, по меньшей мере 89 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

В другом аспекте, изобретение предусматривает антитело, содержащее домен  $V_L$ , который на по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 86 %, по меньшей мере 87 %, по меньшей мере 88 %, по меньшей мере 89 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 % по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

В другом аспекте, изобретение предусматривает антитело, содержащее фрагмент или область антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6. В одном варианте реализации, фрагмент представляет собой легкую цепь антитела G1. В другом варианте реализации, фрагмент представляет собой тяжелую цепь антитела G1.

5 В еще одном варианте реализации, фрагмент содержит одну или несколько переменных областей из легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1. В еще одном варианте реализации, фрагмент содержит одну или несколько переменных областей из легкой цепи и/или тяжелой цепи, представленных на Фигуре 5. В еще одном варианте реализации, фрагмент содержит один или несколько CDR из легкой цепи  
10 и/или тяжелой цепи антитела G1.

В другом аспекте, изобретение предусматривает полипептиды (которые могут быть или не быть антителом), содержащие  $V_H$  CDR3, как представлено в SEQ ID NO: 5, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 5 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными замещениями. В конкретном варианте реализации, такие  
15 аминокислотные замещения являются консервативными замещениями.

В другом аспекте, изобретение предусматривает полипептиды (которые могут быть или не быть антителом), содержащие  $V_L$  CDR3, как представлено в SEQ ID NO: 8, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 8 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными замещениями. В конкретном варианте реализации, такие  
20 аминокислотные замещения являются консервативными замещениями.

В другом аспекте, изобретение предусматривает полипептиды (которые могут быть или не быть антителом), содержащие любой один или несколько из следующих:  
а) один или несколько CDR(s) антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; б) CDR H3 из тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов,  
25 представленных в Таблице 6; в) CDR L3 из легкой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; д) три CDR из легкой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; е) три CDR из тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; ф) три CDR из легкой цепи и три CDR из тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6. В  
30 некоторых вариантах реализации, изобретение дополнительно предусматривает полипептиды (которые могут быть или не быть антителом), содержащие любой один или несколько из следующих: а) один или несколько (один, два, три, четыре, пять или шесть) CDR(s), выделенных из антитела G1 или его вариантов, представленных в

Таблице 6; b) CDR, выделенный из CDR H3 из тяжелой цепи антитела G1; и/или c) CDR, выделенный из CDR L3 из легкой цепи антитела G1. В некоторых вариантах реализации, CDR представляет собой CDR, представленный на Фигуре 5. В некоторых вариантах реализации, один или несколько CDR, выделенных из антитела G1 или его 5 вариантов, представленных в Таблице 6, являются на по меньшей мере около 85 %, по меньшей мере около 86 %, по меньшей мере около 87 %, по меньшей мере около 88 %, по меньшей мере около 89 %, по меньшей мере около 90 %, по меньшей мере около 91 %, по меньшей мере около 92 %, по меньшей мере около 93 %, по меньшей мере около 94 %, по меньшей мере около 95 %, по меньшей мере около 96 %, по меньшей мере 10 около 97 %, по меньшей мере около 98 %, или по меньшей мере около 99 % идентичными по отношению к по меньшей мере одному, по меньшей мере двум, по меньшей мере трем, по меньшей мере четырем, по меньшей мере пяти, или по меньшей мере шести CDR G1 или его вариантов.

В некоторых вариантах реализации, CDR представляет собой CDR по системе 15 Kabat. В других вариантах реализации, CDR представляет собой CDR по системе Chothia. В других вариантах реализации, CDR представляет собой комбинацию CDR по системам Kabat и Chothia (также называемую "объединенный CDR" или "расширенный CDR"). Другими словами, для любого данного варианта реализации, содержащего более одного CDR, причем CDR могут быть любыми из Kabat, Chothia, 20 и/или объединенных.

В некоторых вариантах реализации, полипептид (такой как антитело) содержит аминокислотную последовательность KASKXaaVXaaTYVS (SEQ ID NO: 53), где Xaa в 25 положении 5 обозначает R, W, G, L, или N; и где Xaa в положении 7 обозначает T, A, D, G, R, S, W, или V. В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность KASKXaaVXaaTYVS (SEQ ID NO: 53) представляет собой CDR1 легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах реализации, полипептид (такой как антитело) содержит аминокислотную последовательность XaaXaaSNRYXaa (SEQ ID NO: 54), где Xaa в 30 положении 1 обозначает G или A; где Xaa в положении 2 обозначает A или H; и где Xaa в положении 7 обозначает L, T, I или S. В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность XaaXaaSNRYXaa (SEQ ID NO: 54) представляет собой CDR2 легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах реализации, полипептид (такой как антитело) содержит аминокислотную последовательность EIRSXaaSDXaaXaaATXaaYAXaaAVKG (SEQ ID NO: 55), где Xaa в положении 5 обозначает E, R, K, Q, или N; где Xaa в положении 8 обозначает A, G, N, E, H, S, L, R, C, F, Y, V, D, или P; где Xaa в положении 9 обозначает S, G, T, Y, C, E, L, A, P, I, N, R, V, D, или M; где Xaa в положении 12 обозначает H или F; где Xaa в положении 15 обозначает E или D. В некоторых вариантах реализации, аминокислотная последовательность EIRSXaaSDXaaXaaATXaaYAXaaAVKG (SEQ ID NO: 55) представляет собой CDR2 тяжелой цепи антитела.

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

15 В некоторых вариантах реализации, антитело представляет собой человеческое антитело. В других вариантах реализации, антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах реализации, антитело является моноклональным. В некоторых вариантах реализации, антитело (или полипептид) является выделенным. В некоторых вариантах реализации, антитело (или полипептид) является по существу чистым.

20 Константная область тяжелой цепи антител может принадлежать к любым типам константной области, таким как IgG, IgM, IgD, IgA, и IgE; и любым изотипам, таким как IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4.

В некоторых вариантах реализации, антитело содержит модифицированную константную область, как описано в данном документе.

В другом аспекте, изобретение предусматривает полинуклеотид (который может быть выделенным), содержащий полинуклеотид, кодирующий фрагмент или область антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6. В одном варианте реализации, фрагмент представляет собой легкую цепь антитела G1. В другом варианте реализации, фрагмент представляет собой тяжелую цепь антитела G1. В еще одном варианте реализации, фрагмент содержит одну или несколько переменных областей из легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1. В еще одном варианте реализации, фрагмент содержит один или несколько (т.е., один, два, три, четыре, пять

или шесть) участков, определяющих комплементарность (CDR) из легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1.

В другом аспекте, изобретение предусматривает полинуклеотид (который может быть выделенным), содержащий полинуклеотид, который кодирует антитело G1 или его варианты, представленные в Таблице 6. В некоторых вариантах реализации, полинуклеотид содержит любой из или оба полинуклеотида, представленные SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10.

В другом аспекте, изобретение предусматривает полинуклеотиды кодирующие любые из антител (включая фрагменты антител) или полипептидов, описанных в данном документе.

В другом аспекте, изобретение предусматривает вектора (включая экспрессионные и клонирующие вектора) и клетки-хозяева, содержащие любой полинуклеотид, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах реализации, вектор представляет собой pDb.CGRP.hFcG1, имеющий № ATCC PTA-6867. В других вариантах реализации, вектор представляет собой pEb.CGRP.hKG1, имеющий № ATCC PTA-6866.

В другом аспекте, изобретение предусматривает клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид, кодирующий любое из антител, описанных в данном документе.

В другом аспекте, изобретение предусматривает комплекс CGRP, связанный с любым из антител или полипептидов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах реализации, антитело представляет собой антитело G1 или его варианты, представленные в Таблице 6.

В другом аспекте, изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую эффективное количество любого из полипептидов (включая антитела, такие как антитело, содержащее один или несколько CDR антитела G1) или полинуклеотидов, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый вспомогательное вещество.

В другом аспекте, изобретение предусматривает способ получения антитела G1, включающий культивацию клетки-хозяина или ее потомства в условиях, позволяющих продуцировать антитела G1, где клетка-хозяин содержит экспрессионный вектор, который кодирует антитело G1; и, в некоторых вариантах реализации, очистку антитела G1. В некоторых вариантах реализации, экспрессионный вектор содержит

одну или обе полинуклеотидные последовательности, представленные SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10.

В другом аспекте, изобретение предусматривает способы получения любых антител или полипептидов, описанных в данном документе, путем экспрессии одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих антитело (которое может экспрессироваться отдельно в виде отдельных легкой или тяжелой цепей, или легкая и тяжелая цепь экспрессируются вместе из одного вектора) или полипептид в пригодной клетке, обычно с последующим извлечением и/или выделением антитела или полипептидов, представляющих интерес.

Антагонистическое антитело против CGRP и полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие антитела и полипептиды по настоящему изобретению, могут быть использованы для лечения, предотвращения, облегчения, контроля или снижения частоты болезней, ассоциированных с аномальной функцией CGRP, таких как головная боль (например, мигрень, кластерная головная боль, хроническая головная боль, и тензионная головная боль) и другие состояния, которые могут лечиться или предотвращаться путем антагонизации активности CGRP.

В другом аспекте, изобретение предусматривает наборы и композиции, содержащие любую одну или несколько композиций, описанных в данном документе. Такие наборы, обычно в пригодной упаковке и снабженные соответствующими инструкциями, пригодны для использования в любом из способов, описанных в данном документе.

В одном аспекте, изобретение предусматривает композицию для использования в соответствии с любым из способов, описанных в данном документе.

В одном аспекте, изобретение предусматривает композицию для использования в лечении или для снижения частоты по меньшей мере одного вазомоторного симптома и/или головной боли у субъекта. В одном варианте реализации, использование включает введение субъекту в течение множества дней некоторого количества моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP, причем количество, вводимое в каждый из множества дней, составляет менее 1000 мг. В одном варианте реализации, использование включает введение субъекту в течение множества дней некоторого количества моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP, причем

количество, вводимое в каждый из множества дней, имеет значение в диапазоне 100-2000 мг. В некоторых вариантах реализации, головная боль представляет собой мигрень (например, хроническую мигрень или эпизодическую мигрень). В некоторых вариантах реализации, два из множества дней разделены интервалом более чем семь

5 дней. В некоторых вариантах реализации, частота головной боли снижается на по меньшей мере семь дней после однократного введения. В некоторых вариантах реализации, количество моноклонального антитела, вводимого в первый день, отличается от (например, превышает) количество моноклонального антитела, вводимого во второй день. В некоторых вариантах реализации, субъекту вводят менее

10 чем 3 дозы в месяц. В некоторых вариантах реализации, введение представляет собой подкожное введение. В некоторых вариантах реализации, введение представляет собой внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации, введение включает использование предварительно наполненного шприца, содержащего определенное количество моноклонального антитела. В некоторых вариантах реализации,

15 композицию моноклонального антитела готовят в концентрации 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл. В некоторых вариантах реализации, количество моноклонального антитела составляет менее 1000 мг. В некоторых вариантах реализации, месячное количество часов головной боли, испытываемой субъектом, снижается после указанного введения

20 на 40 или более часов (например 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, или более) по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения. Месячное количество часов головной боли могут быть уменьшено более чем на 60 часов. В некоторых вариантах реализации, месячное количество часов головной боли, испытываемой субъектом, после указанного введения, снижается на 25 % или больше (например, 30 %, 35 %, 40

25 %, 45 %, 50 %, или больше) по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения. Месячное количество часов головной боли могут быть уменьшено на 40 % или больше. В некоторых вариантах реализации, месячное количество дней головной боли, испытываемой субъектом, снижается после указанного введения на 3 или больше

30 дней (например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше дней) по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения. В некоторых вариантах реализации, использование дополнительно включает введение субъекту второго агента одновременно или последовательно с моноклональным антителом. Второй агент может быть любым из агонистов 5-HT<sub>1</sub>, триптанов, алкалоидов спорыньи

и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. В некоторых вариантах реализации, второй агент представляет собой агент, принимаемый субъектом профилактически. В некоторых вариантах реализации, месячное применение второго агента субъектом снижается на по меньшей мере 15 % после введения моноклонального антитела. В некоторых вариантах реализации, второй агент представляет собой триптан. В некоторых вариантах реализации, субъект является человеком. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным моноклональным антителом. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело включает (а) антитело, имеющее CDR H1, как представлено в SEQ ID NO: 3; CDR H2, как представлено в SEQ ID NO: 4; CDR H3, как представлено в SEQ ID NO: 5; CDR L1, как представлено в SEQ ID NO: 6; CDR L2, как представлено в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, как представлено в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела в соответствии с (а), как показано в Таблице 6.

В одном аспекте, изобретение предусматривает композицию, используемую для снижения величины месячного количества часов головной боли, испытываемой субъектом. В одном варианте реализации, использование включает введение субъекту количества моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, где количество моноклонального антитела эффективно снижает величину месячного количества часов головной боли на по меньшей мере 20 (например 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или больше часов головной боли) после разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, величина месячного количества часов головной боли снижается на по меньшей мере около 50 часов. В одном варианте реализации, использование включает введение субъекту количества моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, где количество моноклонального антитела эффективно снижает величину месячного количества часов головной боли на по меньшей мере 15 % (например 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, или больше) после разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, величина месячного количества часов головной боли снижается на по меньшей мере около 30 %. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело представляет собой антагонистическое антитело против CGRP. В некоторых вариантах реализации, количество моноклонального антитела составляет менее 1000 мг. В некоторых вариантах реализации, субъекту вводят меньше чем 3 дозы в месяц. В некоторых вариантах реализации, введение представляет собой подкожное или внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации,

композицию моноклонального антитела готовят в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации, (в которых) моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл. В некоторых вариантах реализации, субъект является человеком. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело является

5 человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело включает (а) антитело, имеющее CDR H1, как представлено в SEQ ID NO: 3; CDR H2, как представлено в SEQ ID NO: 4; CDR H3, как представлено в SEQ ID NO: 5; CDR L1, как представлено в SEQ ID NO: 6; CDR L2, как представлено в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, как представлено в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела

10 в соответствии с (a), как показано в Таблице 6.

В одном аспекте, изобретение предусматривает композицию, используемую для снижения величины месячного количества дней головной боли, испытываемой субъектом. В одном варианте реализации, использование включает введение субъекту количества моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, где

15 количество моноклонального антитела эффективно снижает величину месячного количества дней головной боли на по меньшей мере 3 (например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше дней головной боли) после разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, величина месячного количества дней головной боли снижается на по меньшей мере около 6 дней головной боли. В

20 некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело представляет собой антагонистическое антитело против CGRP. В некоторых вариантах реализации, количество моноклонального антитела составляет менее 1000 мг. В некоторых вариантах реализации, субъекту вводят меньше чем 3 дозы в месяц. В некоторых вариантах реализации, введение представляет собой подкожное или внутривенное

25 введение. В некоторых вариантах реализации, композицию моноклонального антитела готовят в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации, (в которых) моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл. В некоторых вариантах реализации, субъект является человеком. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным.

30 В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело включает (а) антитело, имеющее CDR H1, как представлено в SEQ ID NO: 3; CDR H2, как представлено в SEQ ID NO: 4; CDR H3, как представлено в SEQ ID NO: 5; CDR L1, как представлено в SEQ

ID NO: 6; CDR L2, как представлено в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, как представлено в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела в соответствии с (a), как показано в Таблице 6.

В одном аспекте, изобретение предусматривает композицию, используемую для снижения использования лекарственного препарата против головной боли у субъекта, включающий введение субъекту моноклонального антитела (например, антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP, где количество моноклонального антитела эффективно снижает месячное применение субъектом лекарственного препарата против головной боли на по меньшей мере 15 % (например 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, или больше). В некоторых вариантах реализации, лекарственный препарат против головной боли выбирают из группы, состоящей из агонистов 5-HT<sub>1</sub>, триптанов, опиатов,  $\beta$ -адренергических антагонистов, алкалоидов спорыньи, и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств (NSAIDs). В некоторых вариантах реализации, лекарственным препаратом против головной боли является триптан. В некоторых вариантах реализации, количество моноклонального антитела составляет менее 1000 мг. В некоторых вариантах реализации, субъекту вводят меньше чем 3 дозы в месяц. В некоторых вариантах реализации, введение представляет собой подкожное или внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации, композицию моноклонального антитела готовят в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации, (в которых) моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл. В некоторых вариантах реализации, субъект является человеком. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело включает (a) антитело, имеющее CDR H1, как представлено в SEQ ID NO: 3; CDR H2, как представлено в SEQ ID NO: 4; CDR H3, как представлено в SEQ ID NO: 5; CDR L1, как представлено в SEQ ID NO: 6; CDR L2, как представлено в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, как представлено в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела в соответствии с (a), как показано в Таблице 6.

В одном аспекте, изобретение предусматривает композицию, используемую для лечения или снижения частоты головной боли (например, мигрени) у субъекта, включающий введение субъекту разовой дозы моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) в количестве, которое модулирует путь CGRP, причем количество моноклонального антитела имеет значение в диапазоне 100-2000 мг.

### Краткое описание чертежей

Фигура 1 представляет собой таблицу, показывающую аффинности связывания 12 мышинных антител для фрагментов человеческого  $\alpha$ -CGRP с разными замещениями аланина. Аффинности связывания измеряли при 25 °C с использованием Biacore путем пропуска Fabs над CGRPs на чипе. Значения в рамке отображают потерю аффинности аланиновых мутантов по сравнению с исходным фрагментом, 25-37 (выделено курсивом), за исключением K35A, который был получен из 19-37 исходного фрагмента. <sup>"a"</sup> указывает аффинности для фрагментов 19-37 и 25-37, представленные как среднее  $\pm$  стандартное отклонение для двух независимых измерений на разных сенсорных чипах. <sup>"b"</sup> указывает взаимодействия, отклоняющиеся от модели простого бимолекулярного взаимодействия вследствие двухфазной диссоциации, аффинности которых определялись с использованием модели конформационных изменений. Значения величин, выделенные серым фоном разной интенсивности: белый (1,0) обозначает исходную аффинность; светло-серый (менее 0,5) обозначает аффинность, повышенную по сравнению с исходной; темно-серый (более 2) обозначает аффинность ниже исходной; и черный указывает, что связывание не наблюдалось.

Фигуры 2A и 2B демонстрируют эффект введения CGRP 8-37 (400 нмоль/кг), антитела 4901 (25 мг/кг) и антитела 7D11 (25 мг/кг) на кожный кровоток, измеренный как поток кровяных клеток после электроимпульсной стимуляции в течение 30 секунд. CGRP 8-37 вводили внутривенно (в/в) за 3-5 мин до электроимпульсной стимуляции. Антитела вводили интраперитонеально (IP) за 72 часа до электроимпульсной стимуляции. Каждая точка на графиках соответствует значению AUC (площадь под кривой) для одной крысы, получавшей препараты в указанных условиях. Каждая линия на графиках обозначает среднее значение AUC для крыс, получавших указанный препарат. AUC (площадь под кривой) равняется произведению  $\Delta$ поток на  $\Delta$ время. " $\Delta$ поток" обозначает изменение величины потока, выраженной в единицах потока после электроимпульсной стимуляции; и " $\Delta$ время" обозначает период времени, необходимый для возвращения величины потока кровяных клеток к уровню до электроимпульсной стимуляции.

Фигура 3 показывает эффект введения разных доз антитела 4901 (25 мг/кг, 5 мг/кг, 2,5 мг/кг, или 1 мг/кг) на кожный кровоток, измеренный как поток кровяных клеток после электроимпульсной стимуляции в течение 30 секунд. Антитела вводили внутривенно (IV) за 24 часа до электроимпульсной стимуляции. Каждая точка на

графике соответствует величине AUC для одной из крыс, получавших указанный препарат. Линия на графике показывает среднее значение AUC для крыс, получавших указанный препарат.

5           Фигуры 4А и 4В демонстрируют эффект введения антитела 4901 (1 мг/кг или 10 мг/кг, в/в), антитела 7Е9 (10 мг/кг, в/в), и антитела 8В6 (10 мг/кг, в/в) на кожный кровоток, измеренный как поток кровяных клеток после электроимпульсной стимуляции в течение 30 секунд. Антитела вводили внутривенно (в/в) с последующей электроимпульсной стимуляцией в моменты времени 30 мин, 60 мин, 90 мин, и 120 мин после введения антитела. Ось Y показывает величину AUC в процентах от уровня  
10       AUC без введения антитела (момент времени 0). Ось X показывает период времени (минут) между введением антител и электроимпульсной стимуляцией. "\*" обозначает  $P < 0,05$ , и "\*\*\*" обозначает  $P < 0,01$ , по сравнению с моментом времени 0. Данные анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа с тестом множественного сравнения Даннета.

15           Фигура 5 показывает аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO:1) и переменного участка легкой цепи (SEQ ID NO:2) антитела G1. CDR по системе Kabat выделены жирным шрифтом, и CDR по системе Chothia - подчеркиванием. Аминокислотные остатки переменных участков тяжелой цепи и легкой цепи пронумерованы последовательно.

20           Фигура 6 изображает картирование эпитопа антитела G1 методом пептидного конкурентного анализа с использованием Biacore. N-биотинилированный человеческий  $\alpha$ -CGRP захватывали на сенсорном чипе SA. Поток связывания Fab G1 (50 нМ) в отсутствие конкурентного пептида или предварительно инкубированный в течение 1 ч с 10 мкМ конкурентного пептида пропускали над чипом. Измеряли связывание  
25       связывания Fab G1 с человеческим  $\alpha$ -CGRP на чипе. Ось Y показывает процент связывания, блокируемый в присутствии конкурентного пептида по сравнению со связыванием в отсутствие конкурентного пептида.

          Фигура 7 показывает эффект введения антитела G1 (1 мг/кг или 10 мг/кг, в/в) или носителя (PBS (фосфатно-солевой буфер), 0,01 % Tween 20) на кожный кровоток,  
30       измеренный как поток кровяных клеток после электроимпульсной стимуляции в течение 30 секунд. Антитело G1 или носитель вводили внутривенно (в/в) с последующей электроимпульсной стимуляцией нерва в моменты времени 30 мин, 60 мин, 90 мин, и 120 мин после введения антитела. Ось Y показывает величину AUC в

процентах от уровня AUC без введения антитела или носителя (принимался за 100 %) (момент времени 0). Ось X показывает период времени (минут) между введением антител и электроимпульсной стимуляцией. "\*" обозначает  $P < 0,05$ , и "\*\*\*\*" обозначает  $P < 0,01$ , по сравнению с носителем. Данные анализировали с использованием

5 двухфакторного дисперсионного анализа и апостериорных тестов Бонферрони.

Фигура 8А показывает эффект введения антитела G1 (1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг, в/в) или носителя (PBS, 0,01 % Tween 20) на кожный кровоток, измеренный как поток кровяных клеток после электроимпульсной стимуляции в течение 30 секунд через 24 часа после введения дозы. Антитело G1 или носитель вводили внутривенно

10 (в/в) за 24 часа до электроимпульсной стимуляции нерва. Ось Y показывает общую площадь под кривой (изменение потока кровяных клеток, умноженное на время от момента стимуляции до возвращения потока к базовой линии, AUC). Ось X показывает различные дозы антитела G1. "\*" обозначает  $P < 0,05$ , и "\*\*\*" обозначает  $P < 0,01$ , по сравнению с носителем. Данные анализировали с использованием однофакторного

15 дисперсионного анализа и теста множественного сравнения Данна.

Фигура 8В показывает эффект введения антитела G1 (0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг, в/в) или носителя (PBS, 0,01 % Tween 20) на кожный кровоток, измеренный как поток кровяных клеток после электроимпульсной стимуляции в течение 30 секунд через 7 дней после введения дозы. Антитело G1 или носитель

20 вводили внутривенно (в/в) за 7 дней до электроимпульсной стимуляции нерва. Ось Y показывает общую AUC. Ось X показывает различные дозы антитела G1. "\*\*\*\*" обозначает  $P < 0,01$ , и "\*\*\*\*\*" обозначает  $P < 0,001$ , по сравнению с носителем. Данные анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа и теста множественного сравнения Данна.

Фигура 8С показывает анализ данных, представленных на Фигурах 8А и 8В, путем аппроксимации кривых. Антитело G1 или носитель вводили внутривенно (в/в) за 24 часа или за 7 дней до электроимпульсной стимуляции нерва. Ось Y показывает общую AUC. Ось X показывает различные дозы антитела G1 в "мг/кг" на логарифмической шкале для определения  $EC_{50}$ .

25

Фигура 9 показывает эффект антитела  $\mu 7E9$  (10 мг/кг), BIBN4096BS или носителя (PBS, 0,01 % Tween 20) на изменение диаметра средней менингеальной артерии после стимуляции электрическим полем. Антитело  $\mu 7E9$ , BIBN4096BS или носитель вводили внутривенно (в/в) в момент времени 0 минут после установления

30

отклика на электрическую стимуляцию. Ось Y показывает изменения диаметра средней менингеальной артерии после стимуляции электрическим полем. Диаметр в состоянии покоя соответствует 0 %. Ось X показывает время (минут) электроимпульсной стимуляции. "\*" обозначает  $P < 0,05$ , и "\*\*\*" обозначает  $P < 0,01$ , по сравнению с носителем. Данные анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа и теста множественного сравнения Даннета.

Фигура 10 показывает эффект различных доз антитела G1 (1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг, в/в) или носителя (PBS, 0,01 % Tween 20) на изменение диаметра средней менингеальной артерии после стимуляции электрическим полем. Антитело G1 или носитель вводили внутривенно (в/в) за 7 дней до стимуляции электрическим полем. Ось Y показывает изменения диаметра средней менингеальной артерии. Диаметр в состоянии покоя соответствует 0 %. Ось X показывает напряжение стимуляции. "\*" обозначает  $P < 0,05$ , "\*\*\*" обозначает  $P < 0,01$ , и "\*\*\*\*" обозначает  $P < 0,001$ , по сравнению с носителем. Данные анализировали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и апостериорных тестов Бонферрони.

Фигура 11А показывает эффект антитела mu4901 (10 мг/кг) или носителя (PBS, 0,01 % Tween 20), при внутривенном (в/в) введении за 24 часа, на снижение внутренней температуры тела, индуцированное подкожной инъекцией налоксона (1 мг/кг), у морфинзависимых крыс. Ось Y показывает разницу температур по сравнению с базовой линией. Ось X показывает время, прошедшее с момента инъекции налоксона.

Фигура 11В показывает эффект антитела mu4901 (10 мг/кг) или носителя (PBS, 0,01 % Tween 20), при внутривенном (в/в) введении за 24 часа, на увеличение температуры поверхности хвоста, индуцированное подкожной инъекцией налоксона (1 мг/кг) у морфинзависимых крыс. Ось Y показывает разницу температур по сравнению с базовой линией. Ось X показывает время, прошедшее с момента инъекции налоксона.

Фигура 12 представляет собой график, иллюстрирующий результаты клинических исследований, сравнивающих эффект разных доз антитела G1 с плацебо.

Фигура 13 представляет собой график, иллюстрирующий результаты клинических исследований, сравнивающих эффект разных доз антитела G1 с плацебо.

Фигура 14 представляет собой график, иллюстрирующий результаты клинических исследований, сравнивающих эффект разных доз антитела G1 с плацебо.

Фигура 15 представляет собой график, иллюстрирующий результаты клинических исследований, сравнивающих эффект разных доз антитела G1 с плацебо.

Фигура 16 представляет собой график, иллюстрирующий результаты клинических исследований, сравнивающих эффект разных доз антитела G1 с плацебо.

Фигура 17 представляет собой график, иллюстрирующий результаты клинических исследований, сравнивающих эффект разных доз антитела G1 с плацебо.

5 Фигура 18 представляет собой график, иллюстрирующий результаты клинических исследований, сравнивающих эффект разных доз антитела G1 с плацебо.

### ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ

В некоторых аспектах, изобретение, раскрытое в данном документе, предусматривает способы лечения и/или предотвращения вазомоторных симптомов (например, приливов крови) у особы путем введения особе терапевтически эффективного количества антагонистического антитела против CGRP.

В некоторых аспектах, изобретение, раскрытое в данном документе, предусматривает способы лечения и/или предотвращения головной боли (например, мигрени, кластерной головной боли, хронической головной боли и головной боли напряжения) у особы путем введения особе терапевтически эффективного количества антагонистического антитела против CGRP. В некоторых случаях, головная боль представляет собой мигрень.

В некоторых аспектах, изобретение, раскрытое в данном документе, также предусматривает антагонистические антитела против CGRP и полипептиды, полученные из G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6. В некоторых вариантах реализации, изобретение также предусматривает способы получения и использования таких антител и полипептидов.

В данной заявке приводятся ссылки на различные публикации (включая патенты и патентные заявки). Описания этих публикаций в полном объеме настоящим включены в данный документ в качестве ссылок.

#### Общие методики

В практике различных аспектов настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, биологии клетки, биохимии и иммунологии, доступные квалифицированным специалистам в данной области техники. Такие методики подробно описаны в литературе, например, 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 реакция, (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).

### *Определения*

“Антитело” представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную специфически связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д., посредством по меньшей мере одного сайта распознавания антигена, расположенного в варибельной области молекулы иммуноглобулина. В используемом в данном документе значении, данный термин охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), одноцепочечные (ScFv), их мутанты, гибридные белки, содержащие участок, являющийся антителом (такие как доменные антитела), и любые другие модифицированные конфигурации молекулы иммуноглобулина, содержащие сайт распознавания антигена. Антитело включает антитела любого класса, такого как IgG, IgA или IgM (или их подкласса), и антитело не должно обязательно принадлежать к какому-либо конкретному классу. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей антитела, иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам. Существуют пять основных классов

иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и несколько из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелых цепей, соответствующие разным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма, и мю, соответственно.

5 Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

В используемом в данном документе значении, "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е., индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за  
10 исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, будучи нацеленными на отдельный антигенный сайт. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые типично включают разные антитела, нацеленные против разных детерминант (эпитопов), каждое  
15 моноклональное антитело нацелено против отдельной детерминанты антигена. Определение "моноклональный" указывает на характер антитела как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не должно истолковываться как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для использования в соответствии с настоящим  
20 изобретением могут быть получены по методу гибридом, впервые описанному Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495, или могут быть получены способами рекомбинантных ДНК, такими как описанные в патент США № 4816567. Моноклональные антитела могут также быть выделены из фаговых библиотек, полученных с использованием способов, описанных, например, в McCafferty et al.,  
25 1990, Nature, 348:552-554.

В используемом в данном документе значении, "гуманизированные" антитела относятся к формам не-человеческих (например, мышинных) антител, которые являются специфическими химерными иммуноглобулинами, цепями иммуноглобулинов, или их  
фрагментами (такими как Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие антигенсвязывающие  
30 субпоследовательности антител), содержащими минимальную последовательность, полученную из не-человеческого иммуноглобулина. Большей частью, гуманизированные антитела являются человеческими иммуноглобулинами (антитело реципиента), в которых остатки из принадлежащего реципиенту участка,

определяющего комплементарность (CDR), замещены на остатки из CDR, принадлежащего не являющемуся человеком вида (донорное антитело), такого как мышь, крыса или кролик, имеющего желательную специфичность, аффинность и биологическую активность. В некоторых случаях, остатки каркасного участка (FR) Fv человеческого иммуноглобулина замещены на соответствующие не принадлежащие человеку остатки. Кроме того, гуманизированное антитело может содержать остатки, не присутствующие ни в антителе реципиента, ни в импортируемых последовательностях CDR или каркасного участка, но включенные для дополнительного уточнения и оптимизации характеристик антитела. В общем, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, и типично двух, переменных доменов, в которых все или по существу все из участков CDR соответствуют не принадлежащему человеку иммуноглобулину, и все или по существу все из участков FR принадлежат консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело будет также содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, типично, человеческого иммуноглобулина. Антитела могут содержать участки Fc, модифицированные как описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизированных антител имеют один или несколько CDR (один, два, три, четыре, пять, шесть), которые являются измененными по сравнению с исходным антителом, которые также называются одним или несколькими CDR, "полученными из" одного или нескольких CDR исходного антитела.

В используемом в данном документе значении, "человеческое антитело" означает антитело, имеющее аминокислотную последовательность соответствующую антителу, продуцируемому человеком, и/или полученное с использованием любых способов получения человеческих антител, известных специалистам или раскрытых в данном документе. Это определение человеческого антитела включает антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой цепи человека или по меньшей мере один полипептид легкой цепи человека. Одним из таких примеров является антитело, содержащее полипептиды мышинной легкой цепи и человеческой тяжелой цепи. Человеческие антитела могут быть получены с использованием различных методик, известных специалистам. В одном варианте реализации, человеческое антитело выбирают из фаговой библиотеки, причем такая фаговая библиотека экспрессирует человеческие антитела (Vaughan et al., 1996, Nature

Biotechnology, 14:309-314; Sheets et al., 1998, PNAS, (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Человеческие антитела также могут быть получены путем введения локусов человеческого иммуноглобулина в трансгенных животных, например, мышей, в которых эндогенные гены иммуноглобулина были частично или полностью инактивированы. Этот подход описан в патентах США №№ 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; и 5661016. Альтернативно, человеческое антитело может быть получено путем иммортализации человеческих В-лимфоцитов, которые продуцируют антитело, направленные против антигена-мишени (такие В-лимфоциты могут быть выделены из индивидуума или могут быть иммунизированы *in vitro*). См., например, Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Voerner et al., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; и патенте США № 5750373.

В используемом в данном документе значении, термин “пептид, кодируемый геном кальцитонина” и “CGRP” относится к любой форме пептида, кодируемого геном кальцитонина, и его вариантам, которые сохраняют по меньшей мере часть активности CGRP. Например, CGRP может быть  $\alpha$ -CGRP или  $\beta$ -CGRP. В используемом в данном документе значении, CGRP включает нативные последовательности CGRP, принадлежащие всем видам млекопитающих, например, человеку, собачьим, кошачьим, лошадиным и бычьим.

В используемом в данном документе значении, “антагонистическое антитело против CGRP” (взаимозаменяемо называемое “антитело против CGRP”) относится к антителу, способному связываться с CGRP и ингибировать биологическую активность CGRP и/или метаболический путь (пути), медируемые сигнализацией CGRP. Антагонистическое антитело против CGRP охватывает антитела, которые модулируют, блокируют, антагонизируют, подавляют или снижают (включая значительно) биологическую активность CGRP, или иначе антагонизируют путь CGRP, включая метаболические пути, медируемые сигнализацией CGRP, такой как связывание рецептора и/или вызывание клеточного ответа на CGRP. В целях настоящего изобретения, следует четко понимать, что термин “антагонистическое антитело против CGRP” охватывает все ранее определенные термины, названия и функциональные состояния и характеристики, посредством которых собственно CGRP, биологическая активность CGRP (включая, без ограничений, его способность медирировать любой аспект головной боли), или последствия биологической активности, по существу

сводятся к нулю, уменьшаются или нейтрализуются в любой значимой степени. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP связывает CGRP и предотвращает связывание CGRP с рецептором CGRP. В других вариантах реализации, антитело против CGRP связывает CGRP и предотвращает активацию рецептора CGRP. Примеры антагонистических антител против CGRP представлены в данном документе.

В используемом в данном документе значении, термины “G1” и “антитело G1” используются взаимозаменяемо по отношению к антителу, продуцируемому экспрессионными векторами, имеющими номера депонирования в ATCC PTA-6867 и ATCC PTA-6866. Аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой цепи и легкой цепи представлены на Фигуре 5. Участки CDR антитела G1 (включая CDR по системам Chothia и Kabat) схематично изображены на Фигуре 5. Полинуклеотиды, кодирующие переменные участки тяжелой и легкой цепей, представлены в SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10. Определение характеристик G1 описано в Примерах.

Термины “полипептид”, “олигопептид”, “пептид” и “белок” используются взаимозаменяемо в данном документе по отношению к полимерам аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может содержать в цепи звенья, не являющиеся аминокислотами. Термины также охватывают полимер аминокислот, который был модифицирован природным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацетилированием, фосфорилированием, или любыми другими манипуляциями или модификациями, такими как конъюгация с компонентом метки. Данное определение также включает, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные специалистам. Следует понимать, что, поскольку полипептиды по данному изобретению основаны на антителе, полипептиды могут существовать в виде одиночной цепи или ассоциированных цепей.

“Полинуклеотид”, или “нуклеиновая кислота”, используемые взаимозаменяемо в данном документе, относятся к полимерам нуклеотидов любой длины, и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут быть дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами, модифицированными нуклеотидами или основаниями, и/или их аналогами, или любым

субстратом, который может быть включен в полимер с помощью ДНК- или РНК-полимеразы. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Модификации структуры нуклеотида, если они присутствуют, могут быть введены до или после сборки полимера.

5 Последовательность нуклеотидов может включать компоненты, не являющиеся нуклеотидами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризация, например, путем конъюгации с компонентом метки. Другие типы модификаций включают, например, “кэпы”, замещение одного или нескольких природных нуклеотидов на аналог, межнуклеотидные модификации, такие как,

10 например, с незаряженными связями (например, метилфосфонаты, полные сложные эфиры фосфорной кислоты, фосфоамидаты, карбаматы и т.д.) и с заряженными связями (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.д.), содержащие присоединенные фрагменты в боковых цепях, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды,  $\rho$ ly-L-лизин и т.д.), содержащие

15 интеркаляторы (например, акридин, псорален и т.д.), содержащие комплексообразователи (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, металлы-окислители и т.д.), содержащие алкилирующие фрагменты, содержащие модифицированные связи (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.), а также немодифицированные формы полинуклеотида (полинуклеотидов).

20 Дополнительно, любая из гидроксильных групп, обычно присутствующих в сахарах, может быть замещена, например, на фосфонатные группы, фосфатные группы, защищена стандартными защитными группами или активирована для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или могут быть конъюгирована с твердыми носителями. 5'- и 3'-концевые ОН могут быть

25 фосфорилированы или замещены аминами или органическими фрагментами кэпирующих групп, содержащими от 1 до 20 атомов углерода. Другие гидроксилы также могут быть дериватизированы в стандартные защитные группы. Полинуклеотиды могут также содержать формы с аналогами рибозных или дезоксирибозных сахаров, являющихся общеизвестными для специалистов, включая,

30 например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибозу, карбоциклические аналоги сахаров,  $\alpha$ -аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и абазические нуклеозидные аналоги, такие как метилрибозид. Одна или

несколько фосфодизэфирных связей могут быть замещены на альтернативные связывающие группы. Такие альтернативные связывающие группы включают, без ограничений, варианты реализации, в которых фосфат замещен на P(O)S (“тиоат”), P(S)S (“дитиоат”), (O)NR<sub>2</sub> (“амидат”), P(O)R, P(O)OR’, CO или CH<sub>2</sub> (“формацеталь”), в которых каждый R или R’ независимо обозначает H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий простую эфирную (-O-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Связи в полинуклеотиде не должны быть все обязательно идентичными. Предшествующее описание относится ко всем полинуклеотидам, упоминаемым в данном документе, включая РНК и ДНК.

10 “Вариабельная область” антитела относится к вариабельной области легкой цепи антитела или вариабельной области тяжелой цепи антитела, по отдельности или в комбинации. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей состоят каждая из четырех каркасных участков (FR), соединенных тремя участками, определяющими комплементарность (CDR), также известными как гипервариабельные области. CDR в 15 каждой цепи удерживаются вместе на небольшом расстоянии друг от друга с помощью FRs и, вместе с CDR другой цепи, участвуют в образовании антиген-связывающего сайта антител. Существует по меньшей мере два способа определения CDR: (1) подход, основанный на перекрестно-видовой вариабельности последовательности (т.е., Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National 20 Institutes of Health, Bethesda MD)); и (2) подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело (Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). В используемом в данном документе значении, CDR могут относиться к CDR, определенным с помощью любого из подходов или комбинации обоих подходов.

25 “Константная область” антитела относится к константной области легкой цепи антитела или константной области тяжелой цепи антитела, по отдельности или в комбинации.

Эпитоп, который “предпочтительно связывается” или “специфически связывается” (используются в данном документе взаимозаменяемо) с антителом или полипептидом, является термином, хорошо понятным специалистам, и способы 30 определения такого специфического или предпочтительного связывания также хорошо известны специалистам. Говорят, что молекула проявляет “специфическое связывание” или “предпочтительное связывание”, если она реагирует или ассоциируется более часто, более быстро, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с

конкретной клеткой или веществом, чем с альтернативными клетками или веществами. Антитело “специфически связывается” или “предпочтительно связывается” с мишенью, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, легче, и/или с большей продолжительностью, чем с другими веществами. Например, антитело, которое специфически или предпочтительно связывается с эпитопом CGRP, представляет собой антитело, которое связывает этот эпитоп с большей аффинностью, авидностью, легче, и/или с большей продолжительностью, чем другие эпитопы CGRP или эпитопы, не относящиеся к CGRP. При прочтении этого определения также понятно, что, например, антитело (или фрагмент или эпитоп), которое специфически или предпочтительно связывается с первой мишенью, может специфически или предпочтительно связываться или не связываться со второй мишенью. По существу, “специфическое связывание” или “предпочтительное связывание” не требует обязательно (хотя и могут включать) исключительное связывание. В общем, но не обязательно, ссылка на связывание подразумевает предпочтительное связывание.

В используемом в данном документе значении, “по существу чистый” относится к материалу, который является на по меньшей мере 50 % чистым (т.е., не содержит загрязнений), более предпочтительно, на по меньшей мере 90 % чистым, более предпочтительно, на по меньшей мере 95 % чистым, более предпочтительно, на по меньшей мере 98 % чистым, более предпочтительно, на по меньшей мере 99 % чистым.

“Клетка-хозяин” включает индивидуальную клетку или культуру клеток, которая может быть или не быть реципиентом для вектора (векторов) для включения полинуклеотидных вставок. Клетки-хозяева включают потомство отдельной клетки-хозяина, и потомство может не быть обязательно полностью идентичным (по морфологии или по комплементу геномной ДНК) исходным родительским клеткам вследствие природной, случайной или целенаправленной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом (полинуклеотидами) по настоящему изобретению.

Термин “Fc-область” используется для обозначения C-концевого участка тяжелой цепи иммуноглобулина. “Fc-область” может быть нативной последовательностью Fc-области или вариантом Fc-области. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут изменяться, Fc-область тяжелой цепи человеческого обычно определяется как проходящая от аминокислотного остатка в

положении Cys226, или от Pro230, до ее карбоксильного конца. Нумерация остатков в Fc-области соответствует EU-индексу, как в системе Kabat. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. Fc-область иммуноглобулина обычно содержит два константных домена, CH2 и CH3.

В используемом в данном документе значении, "Fc-рецептор" и "FcR" описывают рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительный FcR представляет собой человеческий FcR с нативной последовательностью. Кроме этого, предпочтительным FcR является такой, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно расщепленные формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют схожие аминокислотные последовательности, различающиеся преимущественно в цитоплазматических доменах. Обзор FcRs приведен в Ravetch and Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel et al., 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; и de Haas et al., 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41. "FcR" также включает неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgGs плоду (Guyer et al., 1976, *J. Immunol.*, 117:587; и Kim et al., 1994, *J. Immunol.*, 24:249).

"Комплемент-зависимая цитотоксичность" и "CDC" относятся к лизису мишени в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом), образующей комплекс со своим антигеном. Для оценки активации комплемента может быть проведен анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

"Функциональная Fc-область" обладает по меньшей мере одной эффекторной функцией Fc-области с нативной последовательностью. Типичные примеры "эффекторных функций" включают связывание C1q; комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; опосредованную антителами клеточную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например В-клеточных рецепторов; BCR) и т.д. Такие эффекторные функции обычно требуют объединения Fc-области со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела) и могут быть определены с

использованием различных анализов, известных специалистам и используемых для оценки таких эффекторных функций антител.

“Fc-область с нативной последовательностью” включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, существующей в природе. “Вариант Fc-области” включает аминокислотную последовательность, которая отличается от Fc-области с нативной последовательностью за счет по меньшей мере одной модификации аминокислоты, но сохраняет по меньшей мере одну эффекторную функцию Fc-области с нативной последовательностью. Предпочтительно, вариант Fc-области имеет по меньшей мере одно аминокислотное замещение по сравнению с Fc-областью с нативной последовательностью или с Fc-областью исходного полипептида, например, от около одного до около десяти аминокислотных замещений, и предпочтительно от около одного до около пяти аминокислотных замещений в Fc-области с нативной последовательностью или в Fc-области исходного полипептида. Вариант Fc-области в данном документе будет предпочтительно обладать по меньшей мере около 80 % идентичности последовательности с Fc-областью с нативной последовательностью и/или с Fc-областью исходного полипептида, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере около 90 % идентичности последовательности с ней, более предпочтительно, по меньшей мере около 95 %, по меньшей мере около 96 %, по меньшей мере около 97 %, по меньшей мере около 98 %, по меньшей мере около 99 % идентичности последовательности с ней.

В используемом в данном документе значении “опосредованная антителами клеточная цитотоксичность” и “ADCC” относятся к клеточно медируемой реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcRs) (например, природные клетки-убийцы (NK), нейтрофилы и макрофаги) распознают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис клетки-мишени. ADCC-активность молекулы, представляющей интерес, может быть оценена с использованием *in vitro* анализа ADCC, такого как описанный в патенте США № 5500362 или 5821337. Пригодные эффекторные клетки для таких анализов включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и NK-клетки. Альтернативно или дополнительно, ADCC-активность молекулы, представляющей интерес, может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как раскрытые в Clynes et al., 1998, PNAS (USA), 95:652-656.

В используемом в данном документе значении, “лечение” представляет собой подход, предназначенный для достижения полезных или желательных клинических результатов. В целях настоящего изобретения, полезные или желательные клинические результаты включают, без ограничений, один или несколько из следующих: улучшение  
5 любого аспекта головной боли, включая уменьшение тяжести, ослабление интенсивности боли и других ассоциированных симптомов, снижение частоты рецидивов, повышение качества жизни лиц, страдающих от головной боли, и уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения головной боли. Для мигрени, другие ассоциированные симптомы включают, без ограничений,  
10 тошноту, рвоту и чувствительность к свету, звукам и/или движениям. Для кластерной головной боли, другие ассоциированные симптомы включают, без ограничений, припухлость под или вокруг глаз, чрезмерная слезливость, покраснение глаз, ринорея или заложенный нос, и покрасневшее лицо.

“Снижение частоты” головной боли означает любой результат из снижения  
15 тяжести (которое может включать уменьшение потребности в и/или количества (например, воздействия) других лекарственных средств и/или терапий, обычно используемых при этом состоянии, включая, например, эрготамина, дигидроэрготамина или триптанов при мигрени), продолжительности и/или частоты (включая, например, задержку или увеличение периода времени до следующего  
20 эпизодического приступа у osoby). Как понятно специалистам в данной области техники, индивидуумы могут различаться по своему отклику на лечение и, по существу, например, “способ снижения частоты головной боли у osoby” отражает введение антагонистического антитела против CGRP на основе обоснованного ожидания, что такое введение может вероятно вызвать такое снижение частоты у  
25 данного конкретного индивидуума.

“Облегчение” головной боли или одного или нескольких симптомов головной боли означает уменьшение или улучшение одного или нескольких симптомов головной боли по сравнению с отсутствием введения антагонистического антитела против CGRP. “Облегчение” также включает сокращение или уменьшение  
30 продолжительности симптома.

В используемом в данном документе значении, “контроль головной боли” относится к поддержанию или снижению тяжести или продолжительности одного или нескольких симптомов головной боли или частоты приступов головной боли у osoby

(по сравнению с уровнем, существовавшим до проведения лечения). Например, продолжительность или тяжесть головной боли, или частоты приступов снижается у osoby на любую величину из по меньшей мере около 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % или 70 %, по сравнению с уровнем до проведения лечения.

5 В используемом в данном документе значении, “час головной боли” относится к часу, на протяжении которого субъект испытывает головную боль. Часы головной боли могут быть выражены в целых часах (например, один час головной боли, два часа головной боли, три часа головной боли и т.д.) или в целых и дробных величинах часов (например, 0,5 часа головной боли, 1,2 часа головной боли, 2,67 часа головной боли и  
10 т.д.). Один или несколько часов головной боли могут быть указаны по отношению к определенному интервалу времени. Например, “часы головной боли в день” могут относиться к числу часов головной боли, которые субъект испытывает на протяжении дня (например, за 24-часовой период времени). В другом примере, “часы головной боли в неделю” могут относиться к числу часов головной боли, которую субъект  
15 испытывает в течение недели (например, за 7-дневный период). Следует понимать, что недельный интервал может соответствовать или не соответствовать календарной неделе. В другом примере, “месячное количество часов головной боли” может относиться к числу часов головной боли, которую субъект испытывает на протяжении месяца. Следует понимать, что месячный интервал (например, период, равный 28-31  
20 дням) может изменяться по числу дней в зависимости от конкретного месяца и могут соответствовать или не соответствовать календарному месяцу. В еще одном примере, “годовое количество часов головной боли” может относиться к числу часов головной боли, которую субъект испытывает на протяжении года. Следует понимать, что годовой интервал (например, период, равный 365 или 366 дням) может изменяться по  
25 числу дней в зависимости от конкретного года и могут соответствовать или не соответствовать календарному году. В некоторых вариантах реализации, час головной боли могут (быть указан) по отношению к конкретному типу головной боли (например, мигрень, кластерная головная боль, хроническая головная боль и тензионная головная боль). Например, “час мигрени” может относиться к часу, на протяжении которого  
30 субъект испытывает мигрень.

В используемом в данном документе значении, “день головной боли” относится к дню, на протяжении которого субъект испытывает головную боль. Дни головной боли могут быть выражены в целых днях (например, один день головной боли, два дня

головной боли, три дня головной боли и т.д.) или в целых и дробных величинах дней (например, 0,5 дня головной боли, 1,2 дня головной боли, 2,67 дней головной боли и т.д.). Один или несколько дней головной боли могут быть указан по отношению к конкретному интервалу времени. Например, "недельное количество дней головной боли" может относиться к числу дней головной боли, которую субъект испытывает в течение недели (например, за 7-дневный период). Следует понимать, что недельный интервал может соответствовать или не соответствовать календарной неделе. В другом примере, "месячное количество дней головной боли" может относиться к числу дней головной боли, которую субъект испытывает в течение месяца. Следует понимать, что месячный интервал (например, период, равный 28-31 дням) может изменяться по числу дней в зависимости от конкретного месяца и могут соответствовать или не соответствовать календарному месяцу. В еще одном примере, "годовое количество дней головной боли" может относиться к числу дней головной боли, которую субъект испытывает в течение года. Следует понимать, что годовой интервал (например, период, равный 365 или 366 дням) может изменяться по числу дней в зависимости от конкретного года и могут соответствовать или не соответствовать календарному году. В некоторых вариантах реализации, день головной боли могут быть указан по отношению к конкретному типу головной боли (например, мигрени, кластерной головной боли, хронической головной боли и головной боли напряжения). Например, "день мигрени" может относиться ко дню, на протяжении которого субъект испытывает мигрень.

В используемом в данном документе значении, "задержка" развития головной боли означает отсрочку, препятствование, замедление, торможение, стабилизацию и/или задержку прогрессирования болезни. Такая задержка может иметь разную продолжительность по времени, в зависимости от истории болезни и/или особ, получающих лечение. Квалифицированному специалисту в данной области техники понятно, что достаточная или значительная задержка может, фактически, охватывать предотвращение, в том смысле, что у индивидуума не происходит развития головной боли (например, мигрени). Способ, который "задерживает" развитие симптома, представляет собой способ, уменьшающий вероятность развития симптома в данный период времени и/или снижающий степень интенсивности симптомов в данный период времени, по сравнению с отсутствием использования способа. Такие сравнения

типично основаны на клинических исследованиях, проводимых с использованием статистически значимого числа субъектов.

“Развитие” или “прогрессирование” головной боли означает начальные проявления и/или последующее прогрессирование расстройства. Развитие головной боли могут детектироваться и оцениваться с использованием стандартных клинических методик, хорошо известных специалистам. Однако, развитие также относится к прогрессированию, которое может быть необнаруживаемым. В целях данного описания, развитие или прогрессирование относится к биологической последовательности проявления симптомов. “Развитие” включает эпизод, рецидив и начальные проявления. В используемом в данном документе значении “начальные проявления” или “эпизод” головной боли включают первичные проявления и/или рецидив.

В используемом в данном документе значении, “эффективная доза” или “эффективное количество” лекарственного препарата, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для обеспечения благоприятных или желательных результатов. При профилактическом применении, благоприятные или желательные результаты включают такие результаты, как устранение или снижение риска, ослабление тяжести или задержка начальных проявлений болезни, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы болезни, ее осложнения и промежуточные патологические фенотипы, проявляющиеся в ходе развития болезни. При терапевтическом применении, благоприятные или желательные результаты включают клинические результаты, такие как снижение интенсивности боли, продолжительности или частоты приступов головной боли, и ослабление одного или нескольких симптомов, вызываемых головной болью (биохимических, гистологических и/или поведенческих), включая ее осложнения и промежуточные патологические фенотипы, проявляющиеся в ходе развития болезни, повышение качества жизни лиц, страдающих от болезни, снижение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения болезни, усиление эффекта другого лекарственного средства, и/или задержку прогрессирования болезни у пациентов. Эффективная доза может быть введена в один или несколько приемов. В целях данного описания, эффективная доза лекарственного препарата, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для проведения профилактического или терапевтического лечения, непосредственно или

косвенно. Как должно быть понятно в клиническом контексте, эффективная доза лекарственного препарата, соединения или фармацевтической композиции могут быть достигнута или не достигнута в сочетании с другим лекарственным препаратом, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, “эффективная доза” может рассматриваться в контексте введения одного или нескольких терапевтических агентов, и отдельный агент может рассматриваться как введенный в эффективном количестве, если, в сочетании с одним или несколькими другими агентами, желательный результат может быть достигнут или достигается.

“Индивидуум” или “субъект” представляет собой млекопитающее, более предпочтительно, человека. Млекопитающие также включают, без ограничений, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних питомцев, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и крыс.

В используемом в данном документе значении, “вектор” означает конструкт, способный доставлять, и предпочтительно экспрессировать один или несколько генов или одну или несколько последовательностей, представляющих интерес, в клетке-хозяине. Примеры векторов включают, без ограничений, вирусные вектора, экспрессионные вектора “голых” ДНК или РНК, плазмидные, космидные или фаговые вектора, экспрессионные вектора ДНК или РНК, ассоциированные с катионными агентами конденсации, экспрессионные вектора ДНК или РНК, инкапсулированные в липосомы, и определенные эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты.

В используемом в данном документе значении, “контрольная последовательность экспрессии” означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая направляет транскрипцию нуклеиновой кислоты. Контрольная последовательность экспрессии могут быть промотором, таким как конститутивный или индуцируемый промотор, или энхансером. Контрольная последовательность экспрессии функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая должна быть транскрибирована.

В используемом в данном документе значении, “фармацевтически приемлемый носитель” или “фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество” включает любой материал, который, в комбинации с активным ингредиентом, позволяет ингредиенту сохранять биологическую активность и является не-реактивным по отношению к иммунной системе субъекта. Примеры включают, без ограничений, любые стандартные фармацевтические носители, такие как забуференный фосфатом

солевой раствор, воду, эмульсии, такие как эмульсия типа "масло в воде", и различные типы смачивающих агентов. Предпочтительными разбавителями для аэрозольного или парентерального введения являются фосфатно-солевой буфер или нормальный (0,9 %) солевой раствор. Композиции, содержащие такие носители, составляют хорошо известные обычными способами (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; и Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000).

Термин " $k_{on}$ ", в используемом в данном документе значении, относится к константе скорости ассоциации антитела с антигеном.

10 Термин " $k_{off}$ ", в используемом в данном документе значении, относится к константе скорости диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген.

Термин " $K_D$ ", в используемом в данном документе значении, относится к константе равновесной диссоциации взаимодействия антитело-антиген.

15 В используемом в данном документе значении, термин "вазомоторный симптом" относится к состояниям, связанным с вазодилатацией. Такая вазодилатация может быть ассоциирована или потенциально ассоциирована с головной болью (такой как мигрень с аурой или без нее; гемиплегическая мигрень; хроническая мигрень; эпизодическая мигрень; частая эпизодическая мигрень; кластерные головные боли; мигренозная невралгия; хронические головные боли; головные боли напряжения; 20 головные боли, вызванные другими медицинскими состояниями (такими как инфекция или повышенное внутричерепное давление вследствие опухоли); хроническая пароксизмальная гемикрания; смешанная головная боль не связанная со структурными повреждениями; головная боль связанные с несосудистыми внутричерепными поражениями; головная боль, ассоциированная с введением вещества или 25 прекращением его введения; головная боль, связанная с инфекцией вне головы; головная боль, связанная с метаболическим расстройством; головная боль, связанная с повреждением черепа, шеи, глаз, ушей, носа и околоносовых полостей, зубов и полости рта или других лицевых или черепных структур; черепные невралгии; и боль в нервном стволе и деафферентационная боль), приливами крови (или 30 приступообразным ощущением жара), приступообразным ощущением холода, бессонницей, нарушениями сна, эмоциональными расстройствами, раздражительностью, чрезмерной потливостью, ночной потливостью, дневной

потливостью, усталостью и т.п., вызванными, в числе прочего, терморегуляторной дисфункцией.

В используемом в данном документе значении, термины "прилив", "прилив крови" и "приступообразное ощущение жара" являются принятыми в данной области  
5 тезники терминами, которые относятся к эпизодическим нарушениям температуры тела, типично заключающимся во внезапном приливе крови к коже, обычно сопровождающимся потением субъекта.

#### А. Способы предотвращения или лечения вазомоторных симптомов и/или головной 10 боли

В одном аспекте, изобретение предусматривает способ лечения или снижения частоты по меньшей мере одного вазомоторного симптома у субъекта. В другом аспекте, изобретение предусматривает способ лечения или уменьшения частоты головной боли (например, мигрени) у субъекта. В некоторых вариантах реализации,  
15 способ включает введение особе эффективного количества антитела или полипептидов, полученных из антитела, которое модулирует путь CGRP (например, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP). В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере один вазомоторный симптом может быть ассоциирован с головной болью (например, мигренью) и/или приливами крови.

В другом аспекте, изобретение предусматривает способ облегчения, контроля, снижения частоты, или задержки развития или прогрессирования по меньшей мере одного вазомоторного симптома у особы, включающий введение особе эффективного количества антагонистического антитела против CGRP. В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере один вазомоторный симптом может быть ассоциирован с  
25 головной болью (например, мигренью) и/или приливами крови.

В другом аспекте, изобретение предусматривает способы облегчения, контроля, снижения частоты, или задержки развития или прогрессирования головной боли (например, мигрени) у особы, или симптомов, ассоциированных с головной болью (например, диареи или светочувствительности), включающий введение особе  
30 эффективного количества антитела, которое модулирует путь CGRP, или антагонистического антитела против CGRP, в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным агентом, пригодным для лечения головной боли.

Такие дополнительные агенты включают, без ограничений, агонисты 5-НТ и NSAID. Например, антитело и по меньшей мере один дополнительный агент могут быть введены совместно, т.е., они могут быть даны с достаточно малым интервалом во времени, чтобы обеспечить перекрывание их индивидуальных терапевтических эффектов. Например, количество агониста 5-НТ или NSAID, введенного в комбинации с антителом против CGRP, должно быть достаточным для снижения частоты рецидивов головной боли у пациентов или продуцирования более длительной эффективности по сравнению с введением любого одного из этих агентов в отсутствие другого. Эта процедура может быть использована для лечения головных болей, относящихся к любому из широкого спектра классов, включая: мигрень с аурой или без нее; гемиплегическая мигрень; хроническая мигрень; эпизодическая мигрень; частая эпизодическая мигрень; кластерные головные боли; мигренозная невралгия; хронические головные боли; головные боли напряжения; головные боли, вызванные другими медицинскими состояниями (такими как инфекция или повышенное внутричерепное давление вследствие опухоли); хроническая пароксизмальная гемикрания; смешанная головная боль, не связанная со структурными повреждениями; головная боль, связанная с несосудистыми внутричерепными поражениями; головная боль, связанная с введением вещества или прекращением его введения; головная боль, связанная с инфекцией вне головы; головная боль, связанная с метаболическим расстройством; головная боль, связанная с повреждением черепа, шеи, глаз, ушей, носа и около носовых полостей, зубов и полости рта или других лицевых или черепных структур; черепные невралгии; и боль в нервном стволе и деафферентационная боль.

Дополнительные неограничительные примеры дополнительных агентов, которые могут быть введены в комбинации с антагонистическим антителом против CGRP, включают один или несколько из:

- (i) опиоидный анальгетик, например, морфин, героин, гидроморфон, оксиморфон, леворфанол, леваллорфан, метадон, меперидин, фентанил, кокаин, кодеин, дигидрокодеин, оксикодон, гидрокодон, пропоксифен, налмефен, налорфин, налоксон, налтрексон, бупренорфин, буторфанол, налбуфин или пентазоцин;
- (ii) нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (NSAID), например, аспирин, диклофенак, дифлусинал, этодолак, фенбуфен, фенопрофен, флуфенисад, флурбипрофен, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, меклофенамовая кислота, мефенамовая кислота, набуметон, напроксен, оксапрозин, фенилбутазон,

- пироксикам, сулиндак, толметин или зомепирак, ингибиторы циклооксигеназы-2 (COX-2), целекоксиб; рофекоксиб; мелоксикам; JTE-522; L-745,337; NS398;, или его фармацевтически приемлемая соль;
- (iii) барбитуратное седативное средство, например, амобарбитал, апробарбитал,
- 5 бутабарбитал, бутабитал, мефобарбитал, метарбитал, метогецитал, пентобарбитал, фенобарбитал (phenobarbital), секобарбитал, талбуттал, теамилал или тиопентал, или его фармацевтически приемлемая соль;
- (iv) барбитуратный анальгетик, например, буталбитал или его фармацевтически приемлемая соль, или композиция, содержащая буталбитал.
- 10 (v) бензодиазепин, обладающий седативным действием, например, хлордиазепоксид, клоразепат, диазепам, флуразепам, лоразепам, оксазепам, темазепам или триазолам, или его фармацевтически приемлемая соль;
- (vi) H<sub>1</sub>-антагонист, обладающий седативным действием, например, дифенгидрамин, пириламид, прометазин, хлорфенирамин или хлорциклизин или его фармацевтически
- 15 приемлемая соль;
- (vii) седативное средство, такое как глутетимид, мепробамат, метаквалон или дихлоралфеназон, или его фармацевтически приемлемая соль;
- (viii) скелетный миорелаксант, например, баклофен, каризопродол, хлорзоксазон, циклобензаприн, метокарбамол или орфренадин или его фармацевтически приемлемая
- 20 соль;
- (ix) антагонист рецептора NMDA, например, декстрометорфан ((+)-3-гидрокси-N-метилморфинан) или его метаболит декстрорфан ((+)-3-гидрокси-N-метилморфинан), кетамин, мемантин, пирролохинолинхинон или цис-4-(фосфонометил)-2-пиперидинкарбоновая кислота или его фармацевтически приемлемая соль;
- 25 (x) альфа-адренергическое средство, например, доксазосин, тамсулозин, клонидин или 4-амино-6,7-диметокси-2-(5-метансульфонамидо-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-2-ил)-5-(2-пиридил)хиназолин;
- (xi) трициклический антидепрессант, например, дезипрамин, имипрамин, амитриптилин или нортриптилин;
- 30 (xii) противосудорожное средство, например, карбамазепин или вальпроат;
- (xiii) антагонист тахикинина (NK), особенно антагонист NK-3, NK-2 или NK-1, например (αR,9R)-7-[3,5-бис(трифторметил)бензил]-8,9,10,11-тетрагидро-9-метил-5-(4-метилфенил)-7H-[1,4]диазоцино[2,1-g][1,7]нафтиридин-6-13-дион (ТАК-637), 5-

[[[(2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-бис(трифторметил)фенил]этокси-3-(4-фторфенил)-4-морфолинил]метил]-1,2-дигидро-3H-1,2,4-триазол-3-он (МК-869), ланепитант, дапитант или 3-[[2-метокси-5-(трифторметокси)фенил]метиламино]-2-фенилпиперидин (2S,3S);

- 5 (xiv) мускариновый антагонист, например, оксибутин, толтеродин, пропиверин, тропсиум хлорид или дарифенацин;
- (xv) ингибитор СОХ-2, например, целекоксиб, рофекоксиб или валдекоксиб;
- (xvi) неселективный ингибитор СОХ (предпочтительно, с защитой желудочно-кишечного (GI) тракта), например, нитрофлурбипрофен (НСТ-1026);
- 10 (xvii) анальгетик, являющийся производным анилина, в частности, парацетамол;
- (xviii) нейролептик, такой как дроперидол;
- (xix) агонист (например, резинфератоксин) или антагонист (например, капсазепин) ваниллоидного рецептора;
- (xix) бета-адренергетик, такой как пропранолол;
- 15 (xx) местный анестетик, такой как мексилетин;
- (xxi) кортикостероид, такой как дексаметазон;
- (xxii) агонист или антагонист серотонинового рецептора;
- (xxiii) холинергический (никотиновый) анальгетик;
- (xxiv) трамадол (Tramadol) (торговая марка);
- 20 (xxv) ингибитор PDEV, такой как силденафил, варденафил или таладафил;
- (xxvi) альфа-2-дельта лиганд, такой как габапентин или прегабалин;
- (xxvii) каннабиноид; и
- (xxviii) антидепрессант, такой как амитриптилин (элавил), тразодон (дезирел) и имипрамин (тофранил) или противосудорожные средства, такие как фенитоин
- 25 (дилантин) или карбамазепин (тегретол).

Квалифицированные специалисты в данной области техники смогут определить пригодные величины дозировок для конкретных агентов для использования в комбинации с антителом против CGRP. Например, суматриптан может быть введен в дозировке от около 0,01 до около 300 мг. В некоторых случаях, суматриптан может

30 быть введен в дозировке от 2 мг до 300 мг. При не-парентеральном введении, типичная доза суматриптана составляет от около 25 до около 100 мг, причем около 50 мг обычно является предпочтительной, а при парентеральном введении предпочтительная доза составляет около 6 мг. Однако, эти дозы могут меняться в соответствии со способами,

являющимися стандартом в данной области техники, с целью их оптимизации для конкретного пациента или для конкретной комбинированной терапии. Дополнительно, например, целекоксиб может быть введен в количестве от 50 до 500 мг.

В другом аспекте, изобретение предусматривает способы облегчения, контроля, снижения частоты, или задержки развития или прогрессирования приливов крови у особы, включающий введение особе эффективного количества антагонистического антитела против CGRP в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным агентом, пригодным для лечения приливов крови. Такие дополнительные агенты включают, без ограничений, гормональные методы лечения, включая эстрогены и/или некоторые прогестины.

В другом аспекте, раскрываемое изобретение предусматривает способ лечения или уменьшения частоты головной боли (например, мигрени) у субъекта, включающий введение субъекту в течение множества дней количества моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации, количество моноклонального антитела, вводимое в каждый из множества дней, может иметь значение в диапазоне 0,1 мг - 5000 мг, 1 мг - 5000 мг, 10 мг - 5000 мг, 100 мг - 5000 мг, 1000 мг - 5000 мг, 0,1 мг - 4000 мг, 1 мг - 4000 мг, 10 мг - 4000 мг, 100 мг - 4000 мг, 1000 мг - 4000 мг, 0,1 мг - 3000 мг, 1 мг - 3000 мг, 10 мг - 3000 мг, 100 мг - 3000 мг, 1000 мг - 3000 мг, 0,1 мг - 2000 мг, 1 мг - 2000 мг, 10 мг - 2000 мг, 100 мг - 2000 мг, 1000 мг - 2000 мг, 0,1 мг - 1000 мг, 1 мг - 1000 мг, 10 мг - 1000 мг или 100 мг - 1000 мг. В некоторых вариантах реализации, указанное количество имеет значение в диапазоне 100 - 2000 мг.

В другом аспекте, раскрываемое изобретение предусматривает способ лечения или уменьшения частоты головной боли (например, мигрени) у субъекта, включающий введение субъекту разовой дозы моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) в количестве, которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации, разовая доза может представлять собой количество антитела в диапазоне 0,1 мг - 5000 мг, 1 мг - 5000 мг, 10 мг - 5000 мг, 100 мг - 5000 мг, 1000 мг - 5000 мг, 0,1 мг - 4000 мг, 1 мг - 4000 мг, 10 мг - 4000 мг, 100 мг - 4000 мг, 1000 мг - 4000 мг, 0,1 мг - 3000 мг, 1 мг - 3000 мг, 10 мг - 3000 мг, 100 мг - 3000 мг, 1000 мг - 3000 мг, 0,1 мг - 2000 мг, 1 мг - 2000 мг, 10 мг - 2000 мг, 100 мг - 2000 мг, 1000 мг - 2000 мг, 0,1 мг - 1000 мг, 1 мг - 1000 мг, 10 мг -

1000 мг или 100 мг - 1000 мг. В некоторых вариантах реализации, разовая доза может представлять собой количество антитела в диапазоне 100 – 2000 мг.

В другом аспекте, раскрываемое изобретение предусматривает способ лечения или снижения частоты по меньшей мере одного вазомоторного симптома у субъекта, включающий введение субъекту в течение множества дней количества моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации, количество моноклонального антитела, вводимое в каждый из множества дней, может иметь значение в диапазоне 0,1 мг - 5000 мг, 1 мг - 5000 мг, 10 мг - 5000 мг, 100 мг - 5000 мг, 1000 мг – 5000 мг, 0,1 мг - 4000 мг, 1 мг - 4000 мг, 10 мг - 4000 мг, 100 мг - 4000 мг, 1000 мг – 4000 мг, 0,1 мг - 3000 мг, 1 мг - 3000 мг, 10 мг - 3000 мг, 100 мг - 3000 мг, 1000 мг – 3000 мг, 0,1 мг - 2000 мг, 1 мг - 2000 мг, 10 мг - 2000 мг, 100 мг - 2000 мг, 1000 мг – 2000 мг, 0,1 мг - 1000 мг, 1 мг - 1000 мг, 10 мг - 1000 мг или 100 мг - 1000 мг. В некоторых вариантах реализации, указанное количество имеет значение в диапазоне 100 – 2000 мг.

В другом аспекте, раскрываемое изобретение предусматривает способ уменьшения величины месячного количества часов головной боли, испытываемой субъектом, включающий введение субъекту количества моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело может использоваться в количестве, эффективном для снижения величины месячного количества часов головной боли на по меньшей мере 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или больше часов головной боли после разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, моноклональное (антитело) может использоваться в количестве, эффективном для снижения величины месячного количества часов головной боли на по меньшей мере 20 часов головной боли после разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело может использоваться в количестве, эффективном для снижения величины месячного количества часов головной боли на по меньшей мере 40 часов головной боли. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело может использоваться в количестве, эффективном для снижения величины месячного количества часов головной боли на по меньшей мере 0,1 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80

%, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % или больше после разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, моноклональное (антитело) может использоваться в количестве, эффективном для снижения величины месячного количества часов головной боли на по меньшей мере 15 % после разовой дозы.

5 В другом аспекте, раскрываемое изобретение предусматривает способ уменьшения величины месячного количества дней головной боли, испытываемой субъектом, включающий введение субъекту количества моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело  
10 может использоваться в количестве, эффективном для снижения величины месячного количества дней головной боли на по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше дней головной боли после разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело может использоваться в количестве, эффективном для снижения величины месячного количества дней головной боли на по  
15 меньшей мере 3 дня головной боли после разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело может использоваться в количестве, эффективном для снижения величины месячного количества дней головной боли на по меньшей мере 0,1 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % или больше после разовой дозы.

В другом аспекте, раскрываемое изобретение предусматривает способ уменьшения использования субъектом лекарственного препарата против головной боли, включающий введение субъекту моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует  
25 путь CGRP. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело может использоваться в количестве, эффективном для снижения месячного применения субъектом лекарственного препарата против головной боли на по меньшей мере 0,1 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % или больше. В  
30 некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело может использоваться в количестве, эффективном для снижения месячного применения субъектом лекарственного препарата против головной боли на по меньшей мере 15 %. Лекарственный препарат против головной боли могут быть лекарственным препаратом

против головной боли любого типа, описанного в любом месте данного документа. Неограничительные примеры лекарственных препаратов против головной боли включают агонисты 5-HT<sub>1</sub> (и агонисты, воздействующие на другие сайты 5-HT<sub>1</sub>), триптаны (например, суматриптан, золмитриптан, наратриптан, ризатриптан, 5 елетриптан, алмотриптан, афроватриптан), алкалоиды спорыньи (например, эрготамин тартрат, эргоновин малеат, и эрголоид мезилаты (например, дигидроэргокорнин, дигидроэргокристин, дигидроэргокриптин, и дигидроэрготамин мезилат (DHE 45)) и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAIDs) (например, аспирин, диклофенак, дифлусинал, этодолак, фенбуфен, фенопрофен, флуфенисад, 10 флурбипрофен, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, меклофенамовую кислоту, мефенамовую кислоту, набуметон, напроксен, оксапрозин, фенилбутазон, пироксикам, сулиндак, толметин или зомепирак, ингибиторы циклооксигеназы-2 (COX-2), целекоксиб; рофекоксиб; мелоксикам; JTE-522; L-745,337; NS398;, или их фармацевтически приемлемые соли), опиаты (например, оксикодон) и β- 15 адренергические антагонисты (например, пропранолол).

Для всех способов, описанных в данном документе, ссылки на антитела (например, моноклональные антитела, которые модулируют путь CGRP, антагонистические антитела против CGRP, моноклональные антагонистические антитела против CGRP) также включают композиции, содержащие один или несколько 20 таких агентов. Соответственно, такая композиция может быть использована в соответствии со способом, относящимся к антителу, описанному в данном документе. Такие композиции могут дополнительно содержать пригодные вспомогательные вещества, такие как фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, как описано в других разделах данного документа. Настоящее изобретение может быть 25 использовано само по себе или в комбинации с другими обычными способами лечения.

Антитело, описанное в данном документе (например, моноклональное антитело, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP) может быть введено индивидууму или субъекту в любой терапевтической дозе, любым пригодным путем и в любой пригодной композиции. 30 Квалифицированному специалисту в данной области техники должно быть понятно, что примеры, описанные в данном документе, должны рассматриваться не в качестве ограничительных, а как иллюстрирующие доступные методики. Соответственно, в некоторых вариантах реализации, антитело, описанное в данном документе, может

быть введено индивидууму в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение, например, в виде болюса или путем непрерывной инфузии на протяжении периода времени, внутримышечным, интраперитонеальным, интрацереброспинальным, подкожным, внутрисуставным, сублингвальным, интраартериальным, интрасиновиальным, с помощью инсуффляции, интратекальным, оральным, с помощью ингаляции, интраназальным (например, с ингаляцией или без нее), буккальным, ректальным, трансдермальным, интракардиальным, внутрикостным, интрадермальным, трансмукозальным, вагинальным, интравитреальным, периартикулярным, локальным, накожным или местным путями. Введение может быть системным, например, внутривенное введение, или локализованным. Коммерчески доступные распылители для жидких композиций, включая струйные распылители и ультразвуковые распылители, являются пригодными для введения. Жидкие композиции могут распыляться непосредственно, а лиофилизированный порошок может быть распылен после восстановления. Альтернативно, антитело, описанное в данном документе, может быть переведено в форму аэрозоля с использованием фторуглеродной композиции и ингалятора с мерной дозой, или вводиться ингаляцией в виде лиофилизированного и размолотого порошка.

В некоторых вариантах реализации, антитело, описанное в данном документе, может быть введено посредством методов сайт-специфической или целевой местной доставки. Примеры методов сайт-специфической или целевой местной доставки включают различные имплантируемые в виде депо источники антитела или катетеры для местной доставки, такие как инфузионные катетеры, постоянный катетер, или игольчатый катетер, искусственные протезы, адвентициальные оболочки, шунты и стенты или другие имплантируемые устройства, сайт-специфические носители, прямые инъекции, или прямое нанесение. См., например, публикацию PCT № WO 00/53211 и патенте США № 5981568.

Различные композиции антитела, описанные в данном документе, могут быть использованы для введения. В некоторых вариантах реализации, антитело может быть введено в чистом виде. В некоторых вариантах реализации, антитело и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество могут образовывать различные композиции. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества известны специалистам, и представляют собой относительно инертные вещества, которые облегчают введение фармакологически эффективного вещества. Например,

вспомогательное вещество может придавать форму или консистенцию, или действовать как разбавитель. Пригодные вспомогательные вещества включают, без ограничений, стабилизаторы, смачивающие агенты и эмульгаторы, соли для изменения осмолярности, капсулирующие агенты, буферы, и средства, усиливающие проницаемость кожи. Вспомогательные вещества, а также композиции для парентеральной и не-парентеральной доставки лекарственного средства, описаны в Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

В некоторых вариантах реализации, композиции таких агентов, включая антитела, описанные в данном документе, могут быть составлены для введения путем инъекции (например, интраперитонеально, внутривенно, подкожно, внутримышечно и т.д.). Соответственно, такие агенты могут быть скомбинированы с фармацевтически приемлемыми носителями, такими как солевой раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и т.п. Конкретная схема приема, т.е., доза, распределение по времени и повторение, будет зависеть от конкретного индивидуума и истории болезни этого индивидуума.

В некоторых вариантах реализации, композиции этих агентов, включая антитела, описанные в данном документе, могут быть составлены для периферического введения. Такие композиции могут быть введены периферически любым пригодным периферическим путем, включая внутривенный и подкожный. Агент, приготовленный для периферического введения, может включать вещество, лекарственное средство и/или антитело, которые не доставляются центрально, спинально, интратекально или непосредственно в ЦНС. Неограничительные примеры путей периферического введения включают путь, являющийся оральным, сублингвальным, буккальным, местным, ректальным, ингаляцией, трансдермальным, подкожным, внутривенным, интраартериальным, внутримышечным, интракардиальным, внутрикостным, интрадермальным, интраперитонеальным, трансмукозальным, вагинальным, интравитреальным, внутрисуставным, периартикулярным, локальным или накожным.

Терапевтические композиции антител, используемые в соответствии с раскрываемым изобретением, могут быть приготовлены для хранения и/или применения путем смешения антитела, имеющего желательную степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th

Ed. Mack Publishing (2000)), и могут в некоторых случаях иметь форму лиофилизированных композиций или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Терапевтическая композиция антитела может содержать один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или стабилизаторов, причем неограничительные примеры таких веществ включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; соли, такие как хлорид натрия; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид, бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин, или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты (например, в концентрации от 0,1 мМ до 100 мМ, от 0,1 мМ до 1 мМ, от 0,01 мМ до 50 мМ, от 1 мМ до 50 мМ, от 1 мМ до 30 мМ, от 1 мМ до 20 мМ, от 10 мМ до 25 мМ), такие как глицин, глутамин, метионин, аспарагин, гистидин, аргинин, или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты (например, в концентрации от 0,001 мг/мл до 1 мг/мл, от 0,001 мг/мл до 1 мг/мл, от 0,001 мг/мл до 0,1 мг/мл, от 0,001 мг/мл до 0,01 мг/мл, от 0,01 мг/мл до 0,1 мг/мл), такие как ЭДТА (например, динатрия ЭДТА дигидрат); сахара (например, в концентрации от 1 мг/мл до 500 мг/мл, от 10 мг/мл до 200 мг/мл, от 10 мг/мл до 100 мг/мл, от 50 мг/мл до 150 мг/мл), такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества (например, в концентрации от 0,01 мг/мл до 10 мг/мл, от 0,01 мг/мл до 1 мг/мл, от 0,1 мг/мл до 1 мг/мл, от 0,01 мг/мл до 0,5 мг/мл) такие как твин (TWEEN<sup>TM</sup>) (например, полисорбат (например, полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80)), плуроник (PLURONICS<sup>TM</sup>) или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Композиция антитела может быть охарактеризована по любому из различных физических свойств. Например, жидкая композиция антитела может иметь любой пригодный pH для обеспечения терапевтической эффективности, безопасности и

хранения. Например, рН жидкой композиции антитела может иметь значение от рН 4 до около рН 9, от рН 5 до рН 8, от рН 5 до рН 7 или от рН 6 до рН 8. В некоторых вариантах реализации, жидкая композиция антитела может иметь рН, равный 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10 или выше или ниже.

5 В другом примере, жидкая композиция антитела может иметь любую пригодную вязкость для обеспечения терапевтической эффективности, безопасности и хранения. Например, вязкость жидкой композиции антитела может иметь значение от 0,5 сантипуаз (сП) до 100 сП, от 1 сП до 50 сП, от 1 сП до 20 сП, от 1 сП до 15 сП или от 5 сП до 15 сП при 25 °С. В некоторых вариантах реализации, жидкая композиция

10 антитела может иметь вязкость 0,5 сП, 1 сП, 1,2 сП, 1,4 сП, 1,6 сП, 1,8 сП, 2,0 сП, 2,2 сП, 2,4 сП, 2,6 сП, 2,8 сП, 3,0 сП, 3,2 сП, 3,4 сП, 3,6 сП, 3,8 сП, 4,0 сП, 4,2 сП, 4,4 сП, 4,6 сП, 4,8 сП, 5,0 сП, 5,2 сП, 5,4 сП, 5,6 сП, 5,8 сП, 6,0 сП, 6,2 сП, 6,4 сП, 6,6 сП, 6,8 сП, 7,0 сП, 7,2 сП, 7,4 сП, 7,6 сП, 7,8 сП, 8,0 сП, 8,2 сП, 8,4 сП, 8,6 сП, 8,8 сП, 9,0 сП, 9,2 сП, 9,4 сП, 9,6 сП, 9,8 сП, 10,0 сП, 10,2 сП, 10,4 сП, 10,6 сП, 10,8 сП, 11,0 сП, 11,2

15 сП, 11,4 сП, 11,6 сП, 11,8 сП, 12,0 сП, 12,2 сП, 12,4 сП, 12,6 сП, 12,8 сП, 13,0 сП, 13,2 сП, 13,4 сП, 13,6 сП, 13,8 сП, 14,0 сП, 14,2 сП, 14,4 сП, 14,6 сП, 14,8 сП, или 15,0 сП при 25 °С, или вязкость может быть выше или ниже.

В другом примере, жидкая композиция антитела может иметь любую пригодную проводимость для обеспечения терапевтической эффективности, безопасности и хранения. Например, проводимость жидкой композиции антитела

20 может иметь значение от 0,1 миллисименс на сантиметр (мСм/см) до 15 мСм/см, от 0,1 мСм/см до 10 мСм/см, от 0,1 мСм/см до 5 мСм/см, от 0,1 мСм/см до 2 мСм/см или от 0,1 мСм/см до 1,5 мСм/см. В некоторых вариантах реализации, жидкая композиция антитела может иметь проводимость, равную 0,19 мСм/см, 0,59 мСм/см, 1,09 мСм/см,

25 1,19 мСм/см, 1,29 мСм/см, 1,39 мСм/см, 1,49 мСм/см, 1,59 мСм/см, 1,69 мСм/см, 1,79 мСм/см, 1,89 мСм/см, 1,99 мСм/см, 2,09 мСм/см, 2,19 мСм/см, 2,29 мСм/см, 2,39 мСм/см, 2,49 мСм/см, 2,59 мСм/см, 2,69 мСм/см, 2,79 мСм/см, 2,89 мСм/см, 2,99 мСм/см, 3,09 мСм/см, 3,19 мСм/см, 3,29 мСм/см, 3,39 мСм/см, 3,49 мСм/см, 3,59 мСм/см, 3,69 мСм/см, 3,79 мСм/см, 3,89 мСм/см, 3,99 мСм/см, 4,09 мСм/см, 4,19

30 мСм/см, 4,29 мСм/см, 4,39 мСм/см, 4,49 мСм/см, 4,59 мСм/см, 4,69 мСм/см, 4,79 мСм/см, 4,89 мСм/см, 4,99 мСм/см, 5,09 мСм/см, 6,09 мСм/см, 6,59 мСм/см, 7,09 мСм/см, 7,59 мСм/см, 8,09 мСм/см, 8,59 мСм/см, 9,09 мСм/см, 9,59 мСм/см, 10,09 мСм/см, 10,59 мСм/см, 11,09 мСм/см, 11,59 мСм/см, 12,09 мСм/см, 12,59 мСм/см, 13,09

мСм/см, 13,59 мСм/см, 14,09 мСм/см, 14,59 мСм/см или 15,09 мСм/см или проводимость может быть выше или ниже.

В другом примере, жидкая композиция антитела может иметь любую пригодную осмоляльность для обеспечения терапевтической эффективности, безопасности и хранения. Например, осмоляльность жидкой композиции антитела может иметь значение от 50 миллиосмоль на килограмм (мОсм/кг) до 5000 мОсм/кг, от 50 мОсм/кг до 2000 мОсм/кг, от 50 мОсм/кг до 1000 мОсм/кг, от 50 мОсм/кг до 750 мОсм/кг или от 50 мОсм/кг до 500 мОсм/кг. В некоторых вариантах реализации, жидкая композиция антитела может иметь осмоляльность, равную 50 мОсм/кг, 60 мОсм/кг, 70 мОсм/кг, 80 мОсм/кг, 90 мОсм/кг, 100 мОсм/кг, 120 мОсм/кг, 140 мОсм/кг, 160 мОсм/кг, 180 мОсм/кг, 200 мОсм/кг, 220 мОсм/кг, 240 мОсм/кг, 260 мОсм/кг, 280 мОсм/кг, 300 мОсм/кг, 320 мОсм/кг, 340 мОсм/кг, 360 мОсм/кг, 380 мОсм/кг, 400 мОсм/кг, 420 мОсм/кг, 440 мОсм/кг, 460 мОсм/кг, 480 мОсм/кг, 500 мОсм/кг, 520 мОсм/кг, 540 мОсм/кг, 560 мОсм/кг, 580 мОсм/кг, 600 мОсм/кг, 620 мОсм/кг, 640 мОсм/кг, 660 мОсм/кг, 680 мОсм/кг, 700 мОсм/кг, 720 мОсм/кг, 740 мОсм/кг, 760 мОсм/кг, 780 мОсм/кг, 800 мОсм/кг, 820 мОсм/кг, 840 мОсм/кг, 860 мОсм/кг, 880 мОсм/кг, 900 мОсм/кг, 920 мОсм/кг, 940 мОсм/кг, 960 мОсм/кг, 980 мОсм/кг, 1000 мОсм/кг, 1050 мОсм/кг, 1100 мОсм/кг, 1150 мОсм/кг, 1200 мОсм/кг, 1250 мОсм/кг, 1300 мОсм/кг, 1350 мОсм/кг, 1400 мОсм/кг, 1450 мОсм/кг, 1500 мОсм/кг, или осмоляльность может быть выше или ниже.

Липосомы, содержащие антитело, могут быть получены способами, известными специалистам, такими как описанные в Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); и патент США №№ 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции раскрыты в патенте США № 5013556. Особенно пригодные липосомы могут быть получены методом обращенно-фазового выпаривания с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-derivatизированный фосфатидилэтанолламин (ПЭГ-ФЭ). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор для получения липосом желательного диаметра.

Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах

доставки лекарственных средств(например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсиях. Такие методики раскрыты в Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

5           Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Пригодные примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем матрицы представляют собой формованные изделия, например, пленки, или микрокапсулы. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли-(2-гидроксиэтилметакрилат), или поли(виниловый спирт)), полилактиды ( патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и 7-этил-L-глутамата, недеградирующий этилен-винилацетат, деградирующие сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и лейпролида ацетата), сахарозы ацетат изобутират, и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота.

          Композиции для использования при *in vivo* введении должны обычно быть стерильными. Это легко обеспечивается, например, фильтрацией через мембраны для стерильной фильтрации. Терапевтическ композиции антитела обычно помещают в контейнер, имеющий порт для стерильного доступа, например, пакет с раствором для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

          Композиции в соответствии с настоящим изобретением могут иметь вид дозированных лекарственных форм, таких как таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, растворы или суспензии, или суппозитории, для орального, парентерального или ректального введения, или введения путем ингаляции или инсуффляции. В некоторых случаях, дозированная лекарственная форма может поставляться в предварительно наполненной емкости (например, предварительно наполненный шприц), пригодной для введения разовой дозы субъекту.

30           Для приготовления твердых композиций, таких как таблетки, основной активный ингредиент может быть смешан с фармацевтическим носителем, например, обычными ингредиентами для изготовления таблеток, такими как кукурузный крахмал, лактоза, сахароза, сорбит, тальк, стеариновая кислота, стеарат магния,

дикальцийфосфат или камеди, и другие фармацевтические разбавители, например, вода, до получения твердой предварительно подготовленной (preformulation) композиции, содержащей гомогенную смесь соединения по настоящему изобретению, или его нетоксичной фармацевтически приемлемой соли. Когда такие предварительно  
5 приготовленные композиции называются гомогенными, это означает, что активный ингредиент равномерно диспергирован в композиции, так чтобы композиция могла быть легко разделена на дозированные лекарственные формы одинаковой эффективности, такие как таблетки, пилюли и капсулы. Эту твердую предварительно  
10 приготовленную композицию затем делят на дозированные лекарственные формы описанного выше типа, содержащие от 0,1 до около 500 мг активного ингредиента по настоящему изобретению. На таблетки или пилюли из новой композиции могут быть нанесено покрытие или они могут быть иначе скомбинированы для получения лекарственной формы, обеспечивающей преимущество пролонгированного действия. Например, таблетка или пилюля может содержать внутренний компонент дозы и  
15 внешний компонент дозы, причем последний имеет форму оболочки первого. Два компонента могут быть разделены энтеросолюбильным слоем, который должен препятствовать разрушению в желудке и позволять внутреннему компоненту проходить в интактном виде в двенадцатиперстную кишку или высвободиться замедленно. Различные материалы могут быть использованы для таких  
20 энтеросолюбильных слоев или покрытий, такие материалы включают ряд полимерных кислот и смеси полимерных кислот с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

Пригодные поверхностно-активные агенты включают, в частности, неионные агенты, такие как полиоксиэтиленсорбитаны (например твин (Tween<sup>TM</sup>) 20, 40, 60, 80  
25 или 85) и другие сорбитаны (например Span<sup>TM</sup> 20, 40, 60, 80 или 85). Композиции с поверхностно-активным агентом будут удобно содержать от 0,05 до 5 % поверхностно-активного агента, и могут иметь его содержание от 0,1 до 2,5 %. Следует понимать, что в случае необходимости могут быть добавлены другие ингредиенты, например, маннит или другие фармацевтически приемлемые носители.

30 Пригодные эмульсии могут быть получены с использованием коммерчески доступных жировых эмульсий, такие как интралипид (Intralipid<sup>TM</sup>), липосин (Liposyn<sup>TM</sup>), инфонутрол (Infonutrol<sup>TM</sup>), липофундин (Lipofundin<sup>TM</sup>) и липифизан (Lipiphysan<sup>TM</sup>). Активный ингредиент может быть или растворен в предварительно

смешанной эмульсионной композиции или, альтернативно, он может быть растворен в масле (например, соевом масле, сафлоровом масле, хлопковом масле, кунжутном масле, кукурузном масле или миндальном масле), и эмульсию получают в результате смешения с фосфолипидом (например, фосфолипидами яйца, соевыми фосфолипидами или соевым лецитином) и водой. Следует понимать, что могут быть добавлены другие ингредиенты, например, глицерин или глюкоза, для регулирования тоничности эмульсии. Пригодные эмульсии будут типично содержать до 20 % масла, например, от 5 до 20 %. Жировая эмульсия может содержать капельки жира (размером) от 0,1 до 1,0 1м, особенно, от 0,1 до 0,5 1м, и иметь рН в диапазоне значений от 5,5 до 8,0.

10 Эмульсионные композиции могут быть, таким образом (those), получены путем смешения антитела с интралипидом (Intralipid<sup>TM</sup>) или его компонентами (соевым маслом, яичными фосфолипидами, глицерином и водой).

Композиции для ингаляции или инсуффляции включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях, или их смеси, и порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать пригодные фармацевтически приемлемые эксципиенты, как указано выше. В некоторых вариантах реализации, композиции вводят оральным или назальным дыхательным путем для локального или системного действия. Композиции в предпочтительно стерильных фармацевтически приемлемых растворителях могут быть распылены путем использования газов. Распыляемые растворы можно вдыхать непосредственно из распыляющего устройства или распыляющее устройство может быть присоединено к 15 лицевой маске, тенту или дыхательному аппарату с прерывистым положительным давлением. Композиции раствора, суспензии или порошка могут быть введены, предпочтительно, орально или назально, из устройств, осуществляющих доставку 20 композиции соответствующим образом.

В некоторых вариантах реализации, композиция, содержащая антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP), описанное в данном документе, может быть приготовлена для 30 любого пригодного пути введения с количеством антитела в диапазоне значений от 0,1 мг до 3000 мг, от 1 мг до 1000 мг, от 100 до 1000 мг, или от 100 до 500 мг. В некоторых случаях, композиция, содержащая антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP,

моноклональное антагонистическое антитело против CGRP), описанное в данном документе, может содержать количество антитела, составляющее, самое большее, или по меньшей мере 0,1 мг, 1 мг, 100 мг, 1 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 325 мг, 350 мг, 375 мг, 400 мг, 450 мг, 475 мг, 500 мг, 525 мг, 550 мг, 575 мг, 600 мг, 625 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 725 мг, 750 мг, 775 мг, 800 мг, 825 мг, 850 мг, 875 мг, 900 мг, 925 мг, 950 мг, 975 мг, 1000 мг, 1100 мг, 1200 мг, 1300 мг, 1400 мг, 1500 мг, 1600 мг, 1700 мг, 1800 мг, 1900 мг, 2000 мг, или 3000 мг.

В некоторых вариантах реализации, жидкая композиция содержащая антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP), описанное в данном документе, может быть приготовлено для любого пригодного пути введения в концентрации антитела в диапазоне значений от 0,1 до 500 мг/мл, от 0,1 до 375 мг/мл, от 0,1 до 250 мг/мл, от 0,1 до 175 мг/мл, от 0,1 до 100 мг/мл, от 1 мг/мл до 500 мг/мл, от 1 мг/мл до 375 мг/мл, от 1 мг/мл до 300 мг/мл, от 1 мг/мл до 250 мг/мл, от 1 мг/мл до 200 мг/мл, от 1 мг/мл до 150 мг/мл, от 1 мг/мл до 100 мг/мл, от 10 мг/мл до 500 мг/мл, от 10 мг/мл до 375 мг/мл, от 10 мг/мл до 250 мг/мл, от 10 мг/мл до 150 мг/мл, от 10 мг/мл до 100 мг/мл, от 100 мг/мл до 500 мг/мл, от 100 мг/мл до 450 мг/мл, от 100 мг/мл до 400 мг/мл, от 100 мг/мл до 350 мг/мл, от 100 мг/мл до 300 мг/мл, от 100 мг/мл до 250 мг/мл, от 100 мг/мл до 200 мг/мл или от 100 мг/мл до 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации, жидкая композиция может содержать антитело, описанное в данном документе в концентрации, составляющей, самое большее, по меньшей мере, или менее чем 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, или 500 мг/мл.

Композиция антитела может содержать один или несколько компонентов, включая антитело и другие вещества, описанные в любом месте данного документа. Антитело и другие компоненты могут присутствовать в любом пригодном количестве и/или любой пригодной концентрации для обеспечения терапевтической эффективности антитела, безопасности и хранения. В одном примере, композиция антитела может быть раствором, содержащим 51,4 мг/мл антитела (например, антитела

G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 20 мМ гистидинаа, 0,1 мг/мл метионинаа, 84 мг/мл трегалозы дигидрата, 0,05 мг/мл динатрия ЭДТА дигидрата, и 0,2 мг/мл полисорбата 80.

5 В другом примере, композиция антитела может содержать 200 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 15 мМ аргининаа, 78 мг/мл сахарозы, 0,3 мг/мл ЭДТА, и 0,1 мг/мл полисорбата 80.

10 В другом примере, композиция антитела может содержать 175 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 20 мМ глицинаа, 88 мг/мл трегалозы дигидрата, 0,015 мг/мл ЭДТА и 0,25 мг/мл полисорбата 80.

15 В другом примере, композиция антитела может содержать 225 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 23 мМ аспарагина, 84 мг/мл сорбита, 0,1 мг/мл ЭДТА и 0,15 мг/мл полисорбата 60.

20 В другом примере, композиция антитела может содержать 150 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 17 мМ аспарагина, 74 мг/мл маннита, 0,025 мг/мл ЭДТА и 0,2 мг/мл полисорбата 80.

В другом примере, композиция антитела может содержать 100 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 16 мМ аргинина, 87 мг/мл маннита, 0,025 мг/мл ЭДТА и 0,15 мг/мл полисорбата 20.

25 В другом примере, композиция антитела может содержать 250 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 25 мМ гистидина, 74 мг/мл маннита, 0,025 мг/мл ЭДТА и 0,25 мг/мл полисорбата 20.

30 В другом примере, композиция антитела может содержать 50 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 19 мМ аргинина, 84 мг/мл сахарозы, 0,05 мг/мл ЭДТА и 0,3 мг/мл полисорбата 80.

В другом примере, композиция антитела может содержать 125 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 22 мМ глицина, 79 мг/мл трегалозы дигидрата, 0,15 мг/мл ЭДТА и 0,15 мг/мл полисорбата 80.

5 В другом примере, композиция антитела может быть раствором, содержащим 175 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 20 мМ гистидина, 0,1 мг/мл метионина, 84 мг/мл трегалозы дигидрата, 0,05 мг/мл динатрия ЭДТА дигидрата, и 0,2 мг/мл полисорбата 80.

10 В другом примере, композиция антитела может содержать 200 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 30 мМ аргинина, 78 мг/мл сахарозы, 0,3 мг/мл ЭДТА, и 0,1 мг/мл полисорбата 80.

15 В другом примере, композиция антитела может содержать 175 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 20 мМ глицина, 88 мг/мл трегалозы дигидрата, 0,015 мг/мл ЭДТА и 0,15 мг/мл полисорбата 80.

20 В другом примере, композиция антитела может содержать 150 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 20 мМ гистидина, 84 мг/мл сахарозы, 0,05 мг/мл ЭДТА и 0,2 мг/мл полисорбата 80.

25 В другом примере, композиция антитела может содержать 225 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 23 мМ гистидина, 84 мг/мл сорбита, 0,1 мг/мл ЭДТА и 0,15 мг/мл полисорбата 60.

В другом примере, композиция антитела может содержать 150 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 17 мМ аспарагина, 74 мг/мл маннита, 0,3 мг/мл ЭДТА и 0,2 мг/мл полисорбата 80.

30 В другом примере, композиция антитела может содержать 100 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 16 мМ аргинина, 87 мг/мл маннита, 0,025 мг/мл ЭДТА и 0,25 мг/мл полисорбата 20.

В другом примере, композиция антитела может содержать 250 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 25 мМ гистидина, 89 мг/мл маннита, 0,025 мг/мл ЭДТА и 0,25 мг/мл полисорбата 20.

5 В другом примере, композиция антитела может содержать 125 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 29 мМ аргинина, 84 мг/мл сахарозы, 0,05 мг/мл ЭДТА и 0,3 мг/мл полисорбата 80.

10 В другом примере, композиция антитела может содержать 150 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 25 мМ аспарагина, 84 мг/мл маннита, 0,05 мг/мл ЭДТА и 0,2 мг/мл полисорбата 80.

15 В другом примере, композиция антитела может содержать 145 мг/мл антитела (например, антитела G1, другого антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP), 22 мМ гистидина, 72 мг/мл трегалозы дигидрата, 0,05 мг/мл ЭДТА и 0,1 мг/мл полисорбата 80.

Антитело, описанное в данном документе, может быть введено с использованием любого пригодного способа, в том числе путем инъекции (например, интраперитонеально, внутривенно, подкожно, внутримышечно и т.д.). Антитела также могут быть введены путем ингаляции, как описано в данном документе. В некоторых случаях, антитело может быть введено назально с ингаляцией или без нее. В общем, для введения антитела, описанного в данном документе, начальный вариант дозировки могут составлять около 2 мг/кг. В целях настоящего изобретения, типичная суточная доза может составлять около от любого значения из от 3 мкг/кг до 30 мкг/кг и до от 300 мкг/кг до 3 мг/кг, до от 30 мг/кг до 100 мг/кг или больше, в зависимости от вышеупомянутых факторов. Например, может быть использована доза, равная около 1 мг/кг, около 2,5 мг/кг, около 5 мг/кг, около 10 мг/кг, м около 25 мг/кг. Для повторного введения на протяжении нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение проводят до достижения желательного подавления симптомов или до достижения достаточных терапевтических уровней, например, для уменьшения боли. Типичный пример схемы приема включает введение начальной дозы, равной около 8,5 мг/кг, с последующим введением еженедельно поддерживающей дозы, равной около 2,8 мг/кг антитела, или с последующим введением поддерживающей дозы, равной

20

25

30

около 2,8 мг/кг раз в две недели. Другой типичный пример схемы приема включает введение дозы 100 мг, 125 мг, 150 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 675 мг, или 900 мг субъекту раз в месяц подкожно. Другой типичный пример схемы приема включает введение начальной дозы 675 мг подкожно, с последующей ежемесячной дозой 225 мг антитела подкожно. Однако, могут быть использованы другие схемы приема, в зависимости от модели фармакокинетического распада, которой хочет достичь практикующий врач. Например, в некоторых вариантах реализации, предусматривается введение доз один-четыре раза в неделю. Прогресс этой терапии легко контролируется обычными способами и анализами. Схема приема (включая используемый антагонист(ы) CGRP) может изменяться со временем.

В некоторых вариантах реализации, доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанные в данном документе и вводимые субъекту могут иметь значения в диапазоне от 0,1 мкг до 3000 мг, от 1 мг до 1000 мг, от 100 до 1000 мг, от 100 до 500 мг, от 0,1 мг до 5000 мг, от 1 мг до 4000 мг, от 250 мг до 1000 мг, от 500 мг до 1000 мг, от 100 мг до 900 мг, от 400 мг до 900 мг, от 10 мг до 3000 мг, от 10 мг до 2000 мг, от 100 мг до 2000 мг, от 150 мг до 2000 мг, от 200 мг до 2000 мг, от 250 мг до 2000 мг, от 300 мг до 2000 мг, от 350 мг до 2000 мг, от 400 мг до 2000 мг, от 450 мг до 2000 мг, от 500 мг до 2000 мг, от 550 мг до 2000 мг, от 600 мг до 2000 мг, от 650 мг до 2000 мг, от 700 мг до 2000 мг, от 750 мг до 2000 мг, от 800 мг до 2000 мг, от 850 мг до 2000 мг, от 900 мг до 2000 мг, от 950 мг до 2000 мг, или от 1000 мг до 2000 мг. В некоторых вариантах реализации, доза или количество антитела, описанные в данном документе и вводимые субъекту, могут составлять, могут составлять самое большее, могут составлять менее чем, или могут составлять по меньшей мере 0,1 мкг, 1 мкг, 100 мкг, 1 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 325 мг, 350 мг, 375 мг, 400 мг, 450 мг, 475 мг, 500 мг, 525 мг, 550 мг, 575 мг, 600 мг, 625 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 725 мг, 750 мг, 775 мг, 800 мг, 825 мг, 850 мг, 875 мг, 900 мг, 925 мг, 950 мг, 975 мг, 1000 мг, 1100 мг, 1200 мг, 1300 мг, 1400 мг, 1500 мг, 1600 мг, 1700 мг, 1800 мг, 1900 мг, 2000 мг, или 3000 мг. В некоторых вариантах реализации, количество имеет значение в диапазоне от 100 до 2000 мг.

В некоторых вариантах реализации, доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанные в данном документе и вводимые субъекту, могут иметь значения в диапазоне от 0,1 до 500, от 0,1 до 100, от 0,1 до 50, от 0,1 до 20, от 0,1 до 10, от 1 до 10, от 1 до 7, 1 до 5 или от 0,1 до 3 мг/кг веса тела. В некоторых вариантах реализации, доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанные в данном документе и вводимые субъекту, могут составлять, могут составлять самое большее, могут составлять менее чем, или могут составлять по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 15,5, 16,0, 16,5, 17,0, 17,5, 18,0, 18,5, 19,0, 19,5, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, или 500 мг/кг веса тела.

В некоторых вариантах реализации, частота, с которой доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) описанн в данном документе, вводится субъекту, может меняться. В некоторых вариантах реализации, разовая доза антитела может быть дана субъекту на протяжении терапии. В некоторых вариантах реализации, частота, с которой доза или количество антитела вводится субъекту, является постоянной (например, вводится раз в месяц). В некоторых вариантах реализации, частота, с которой доза или количество антитела, описанные в данном документе, вводится субъекту, является переменной (например, начальная доза со следующей дозой через месяц, с последующими дополнительными дозами через три месяца и семь месяцев). В некоторых вариантах реализации, частота, с которой антитело вводится субъекту, составляет, составляет по меньшей мере, составляет менее чем, или составляет самое большее один, два, три, четыре, пять или шесть раз в день. В некоторых вариантах реализации, частота, с которой антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное

антагонистическое антитело против CGRP) вводится субъекту, составляет, составляет по меньшей мере, составляет менее чем, или составляет самое большее одну, две, три, четыре, пять или шесть дозу (доз) в день.

В некоторых вариантах реализации, частота, с которой доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в данном документе, вводится субъекту, составляет, составляет по меньшей мере, составляет менее чем, или составляет самое большее один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать раз в каждые один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать, двадцать один, двадцать два, двадцать три, двадцать четыре, двадцать пять, двадцать шесть, двадцать семь, двадцать восемь, двадцать девять, тридцать, тридцать один, тридцать два, тридцать три, тридцать четыре, тридцать пять, тридцать шесть, тридцать семь, тридцать восемь, тридцать девять, сорок, сорок один, сорок два, сорок три, сорок четыре, сорок пять, сорок шесть, сорок семь, сорок восемь, сорок девять, пятьдесят, пятьдесят пять, шестьдесят, шестьдесят пять, семьдесят, семьдесят пять, восемьдесят, восемьдесят пять, девяносто, девяносто пять, сто, сто двадцать пять, сто пятьдесят, сто восемьдесят, или двести дней.

В некоторых вариантах реализации, частота, с которой доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в данном документе, вводится субъекту, составляет, составляет по меньшей мере, составляет менее чем, или составляет самое большее один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать раз в каждые один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать, двадцать один, двадцать два, двадцать три, двадцать четыре, двадцать пять, двадцать шесть, двадцать семь, двадцать восемь, двадцать девять, тридцать, тридцать

один, тридцать два, тридцать три, тридцать четыре, тридцать пять, тридцать шесть, тридцать семь, тридцать восемь, тридцать девять, сорок, сорок один, сорок два, сорок три, сорок четыре, сорок пять, сорок шесть, сорок семь, сорок восемь, сорок девять, пятьдесят, пятьдесят пять, шестьдесят, шестьдесят пять, семьдесят, семьдесят пять, 5  
восемьдесят, восемьдесят пять, девяносто, девяносто пять, или сто недель. В некоторых вариантах реализации, частота, с которой антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP), описанное в данном документе, вводится субъекту, составляет менее чем одна, две, 10  
три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, или пятнадцать доз в неделю.

В некоторых вариантах реализации, частота, с которой доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического 15  
антитела против CGRP) вводится субъекту, составляет, составляет по меньшей мере, составляет менее чем, или составляет самое большее один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или 20  
двадцать раз за каждый месяц, каждые два месяца, каждые три месяца, каждые четыре месяца, каждые пять месяцев, каждые шесть месяцев, каждые семь месяцев, каждые восемь месяцев, каждые девять месяцев, каждые десять месяцев, каждые одиннадцать месяцев, каждые двенадцать месяцев, каждые тринадцать месяцев, каждые 25  
четырнадцать месяцев, каждые пятнадцать месяцев, каждые шестнадцать месяцев, каждые семнадцать месяцев, или каждые восемнадцать месяцев. В некоторых вариантах реализации, частота, с которой антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP), описанное в данном документе, вводится субъекту, составляет менее чем один, два, три, четыре, пять, 30  
шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, или пятнадцать доз в месяц. В некоторых вариантах реализации, доза или количество антитела может быть введена (например, подкожно или внутривенно) субъекту один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз или больше в месяц.

В некоторых вариантах реализации, антитело в дозе или количестве 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1450 мг, 1500 мг, 1550 мг, 1600 мг, 1650 мг, 1700 мг, 1750 мг, 1800 мг, 1850 мг, 1900 мг, 1950 мг, 2000 мг, 2050 мг, 2100 мг, 2150 мг, 2200 мг, 2250 мг, 2300 мг, 2350 мг, 2400 мг, 2450 мг, 2500 мг, 2550 мг, 2600 мг, 2650 мг, 2700 мг, 2750 мг, 2800 мг, 2850 мг, 2900 мг, 2950 мг, 3000 мг или больше может быть введено (например, подкожно или внутривенно) субъекту раз в месяц. В некоторых вариантах реализации, антитело в дозе или количестве от 0,1 мг до 5000 мг, от 1 мг до 4000 мг, от 10 мг до 3000 мг, от 10 мг до 2000 мг, от 100 мг до 2000 мг, от 150 мг до 2000 мг, от 200 мг до 2000 мг, от 250 мг до 2000 мг, от 300 мг до 2000 мг, от 350 мг до 2000 мг, от 400 мг до 2000 мг, от 450 мг до 2000 мг, от 500 мг до 2000 мг, от 550 мг до 2000 мг, от 600 мг до 2000 мг, от 650 мг до 2000 мг, от 700 мг до 2000 мг, от 750 мг до 2000 мг, от 800 мг до 2000 мг, от 850 мг до 2000 мг, от 900 мг до 2000 мг, от 950 мг до 2000 мг, или от 1000 мг до 2000 мг, от может быть введено (например, подкожно или внутривенно) субъекту раз в месяц. В некоторых вариантах реализации, 100-2000 мг антитела вводят раз в месяц.

В некоторых вариантах реализации, антитело в дозе или количестве 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1450 мг, 1500 мг, 1550 мг, 1600 мг, 1650 мг, 1700 мг, 1750 мг, 1800 мг, 1850 мг, 1900 мг, 1950 мг, 2000 мг, 2050 мг, 2100 мг, 2150 мг, 2200 мг, 2250 мг, 2300 мг, 2350 мг, 2400 мг, 2450 мг, 2500 мг, 2550 мг, 2600 мг, 2650 мг, 2700 мг, 2750 мг, 2800 мг, 2850 мг, 2900 мг, 2950 мг, 3000 мг, или больше может вводиться (например, подкожно или внутривенно) субъекту раз в три месяца. В некоторых вариантах реализации, антитело в дозе или количестве от 0,1 мг до 5000 мг, от 1 мг до 4000 мг, от 10 мг до 3000 мг, от 10 мг до 2000 мг, от 100 мг до 2000 мг, от 150 мг до 2000 мг, от 200 мг до 2000 мг, от 250 мг до 2000 мг, от 300 мг до 2000 мг, от 350 мг до 2000 мг, от 400 мг до 2000 мг, от 450 мг до 2000 мг, от 500 мг до 2000 мг, от 550 мг до 2000 мг, от 600 мг до 2000 мг, от 650 мг до 2000 мг, от 700 мг до 2000 мг, от 750 мг до 2000 мг, от 800 мг до 2000 мг, от 850 мг до 2000 мг, от 900 мг до 2000 мг, от 950 мг до 2000 мг, или от 1000 мг до 2000 мг может вводиться (например, подкожно

или внутривенно) субъекту раз в три месяца. В некоторых вариантах реализации, от 450 мг до 2000 мг вводят один раз в три месяца или меньше.

В некоторых вариантах реализации, антитело в дозе или количестве 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1450 мг, 1500 мг, 1550 мг, 1600 мг, 1650 мг, 1700 мг, 1750 мг, 1800 мг, 1850 мг, 1900 мг, 1950 мг, 2000 мг, 2050 мг, 2100 мг, 2150 мг, 2200 мг, 2250 мг, 2300 мг, 2350 мг, 2400 мг, 2450 мг, 2500 мг, 2550 мг, 2600 мг, 2650 мг, 2700 мг, 2750 мг, 2800 мг, 2850 мг, 2900 мг, 2950 мг, 3000 мг, или больше может вводиться (например, подкожно или внутривенно) субъекту через каждые шесть месяцев. В некоторых вариантах реализации, антитело в дозе или количестве от 0,1 мг до 5000 мг, от 1 мг до 4000 мг, от 10 мг до 3000 мг, от 10 мг до 2000 мг, от 100 мг до 2000 мг, от 150 мг до 2000 мг, от 200 мг до 2000 мг, от 250 мг до 2000 мг, от 300 мг до 2000 мг, от 350 мг до 2000 мг, от 400 мг до 2000 мг, от 450 мг до 2000 мг, от 500 мг до 2000 мг, от 550 мг до 2000 мг, от 600 мг до 2000 мг, от 650 мг до 2000 мг, от 700 мг до 2000 мг, от 750 мг до 2000 мг, от 800 мг до 2000 мг, от 850 мг до 2000 мг, от 900 мг до 2000 мг, от 950 мг до 2000 мг, или от 1000 мг до 2000 мг может вводиться (например, подкожно или внутривенно) субъекту через каждые шесть месяцев. В некоторых вариантах реализации, от 450 мг до 2000 мг вводят один раз в каждые шесть месяцев или меньше.

В некоторых вариантах реализации, частота, с которой доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) вводится субъекту (например, подкожно или внутривенно), составляет, составляет по меньшей мере, составляет менее чем, или составляет самое большее один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать раз в каждый квартал. Следует понимать, что “квартал” может относиться к периоду времени, равному четверти года, или могут также относиться к календарному кварталу, такому как период времени с 1 января по 31 марта, с 1 апреля по 30 июня, с 1 июля по 30 сентября или с 1 октября по 31 декабря. В некоторых случаях, “квартал” может относиться к периоду времени, равному приблизительно трем месяцам.

В некоторых вариантах реализации, антитело в дозе или количестве 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1450 мг, 1500 мг, 1550 мг, 1600 мг, 1650 мг, 1700 мг, 1750 мг, 1800 мг, 1850 мг, 1900 мг, 1950 мг, 2000 мг, 2050 мг, 2100 мг, 2150 мг, 2200 мг, 2250 мг, 2300 мг, 2350 мг, 2400 мг, 2450 мг, 2500 мг, 2550 мг, 2600 мг, 2650 мг, 2700 мг, 2750 мг, 2800 мг, 2850 мг, 2900 мг, 2950 мг, 3000 мг, или больше может вводиться (например, подкожно или внутривенно) субъекту каждый квартал. В некоторых вариантах реализации, антитело в дозе или количестве от 0,1 мг до 5000 мг, от 1 мг до 4000 мг, от 10 мг до 3000 мг, от 10 мг до 2000 мг, от 100 мг до 2000 мг, от 150 мг до 2000 мг, от 200 мг до 2000 мг, от 250 мг до 2000 мг, от 300 мг до 2000 мг, от 350 мг до 2000 мг, от 400 мг до 2000 мг, от 450 мг до 2000 мг, от 500 мг до 2000 мг, от 550 мг до 2000 мг, от 600 мг до 2000 мг, от 650 мг до 2000 мг, от 700 мг до 2000 мг, от 750 мг до 2000 мг, от 800 мг до 2000 мг, от 850 мг до 2000 мг, от 900 мг до 2000 мг, от 950 мг до 2000 мг, или от 1000 мг до 2000 мг может вводиться (например, подкожно или внутривенно) субъекту каждый квартал.

В некоторых вариантах реализации, частота, с которой вводится доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), составляет, составляет по меньшей мере, составляет менее чем, или составляет самое большее один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать раз каждый год, каждые два года, каждые три года, каждые четыре года, или каждые пять лет. В некоторых вариантах реализации, частота, с которой антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP) вводится субъекту, составляет менее чем одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать, двадцать одна, двадцать две, двадцать три, двадцать четыре или двадцать пять доз в год.

В некоторых вариантах реализации, антитело в дозе или количестве 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1450 мг, 1500 мг, 1550 мг, 1600 мг, 1650 мг, 1700 мг, 1750 мг, 1800 мг, 1850 мг, 1900 мг, 1950 мг, 2000 мг, 2050 мг, 2100 мг, 2150 мг, 2200 мг, 2250 мг, 2300 мг, 2350 мг, 2400 мг, 2450 мг, 2500 мг, 2550 мг, 2600 мг, 2650 мг, 2700 мг, 2750 мг, 2800 мг, 2850 мг, 2900 мг, 2950 мг, 3000 мг, или больше может быть введено субъекту один раз в год. В некоторых вариантах реализации, антитело в дозе или количестве от 0,1 мг до 5000 мг, от 1 мг до 4000 мг, от 10 мг до 3000 мг, от 10 мг до 2000 мг, от 100 мг до 2000 мг, от 150 мг до 2000 мг, от 200 мг до 2000 мг, от 250 мг до 2000 мг, от 300 мг до 2000 мг, от 350 мг до 2000 мг, от 400 мг до 2000 мг, от 450 мг до 2000 мг, от 500 мг до 2000 мг, от 550 мг до 2000 мг, от 600 мг до 2000 мг, от 650 мг до 2000 мг, от 700 мг до 2000 мг, от 750 мг до 2000 мг, от 800 мг до 2000 мг, от 850 мг до 2000 мг, от 900 мг до 2000 мг, от 950 мг до 2000 мг, или от 1000 мг до 2000 мг может быть введено субъекту один раз в год. В некоторых вариантах реализации, от 450 мг до 2000 мг вводят один раз в год или меньше.

В некоторых вариантах реализации, способ может включать введение антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в данном документе субъекту в течение множества дней. Два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или больше дней из множества дней могут быть разделены более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или больше днями. В некоторых вариантах реализации, два из множества дней разделены интервалом более чем один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать, двадцать один, двадцать два, двадцать три, двадцать четыре, двадцать пять, двадцать шесть, двадцать семь, двадцать восемь, двадцать девять, тридцать или больше дней. Кроме того, в некоторых вариантах реализации, количество антитела, вводимого в первый день из множества дней может отличаться (например, быть больше или меньше) от количества антитела, вводимого во второй день.

В некоторых вариантах реализации, начальная доза (например, ударная доза) антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в данном документе, может быть введена субъекту, с последующим введением одной или нескольких дополнительных доз с желательными интервалами. В некоторых вариантах реализации, начальная доза и одна или несколько дополнительных доз являются одинаковыми. В некоторых вариантах реализации, одна или несколько дополнительных доз отличаются от начальной дозы. В некоторых вариантах реализации, частота, с которой вводятся одна или несколько дополнительных доз, является постоянной (например, каждый месяц). В некоторых вариантах реализации, частота, с которой вводятся одна или несколько дополнительных доз, меняется (например, одна дополнительная доза вводится через один месяц после начальной дозы, с последующим введением другой дополнительной дозы через три месяца после начальной дозы). Могут использоваться любая желательная и/или терапевтическая схема введения начальной ударной дозы, дополнительных доз, и частота дополнительных доз (например, включая описанные в данном документе). Типичный пример схемы лечения включает начальную ударную дозу 675 мг антагонистического антитела против CGRP, вводимую подкожно, с последующими поддерживающими дозами 225 мг антитела, вводимыми подкожно с интервалами в один месяц.

В некоторых вариантах реализации, субъекту может быть введена начальная доза антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), равная 0,1мкг, 1 мкг, 100 мкг, 1 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 325 мг, 350 мг, 375 мг, 400 мг, 450 мг, 475 мг, 500 мг, 525 мг, 550 мг, 575 мг, 600 мг, 625 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 725 мг, 750 мг, 775 мг, 800 мг, 825 мг, 850 мг, 875 мг, 900 мг, 925 мг, 950 мг, 975 мг, 1000 мг, 1500 мг, 2000 мг, или 3000 мг с последующими одной или несколькими дополнительными дозами антитела, равными 0,1мкг, 1 мкг, 100 мкг, 1 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 325 мг, 350 мг, 375 мг, 400 мг, 450 мг, 475 мг, 500 мг, 525 мг, 550 мг, 575 мг, 600 мг, 625 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 725 мг, 750 мг, 775 мг, 800 мг, 825 мг, 850 мг, 875 мг, 900 мг, 925 мг, 950 мг, 975 мг, 1000 мг, 1500 мг, 2000 мг, или 3000 мг.

В некоторых вариантах реализации, доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в данном документе, может быть разделена на поддозы и введена в виде множества поддоз, в зависимости, например, от пути введения и/или конкретной вводимой композиции. Например, в случаях, когда доза вводится подкожно, подкожная доза может быть разделена на множество поддоз, и каждая поддоза вводится в разные места во избежание, например, большой разовой подкожной инъекции в одно место. Например, подкожная доза 900 мг может быть разделена на четыре поддозы по 225 мг каждая и каждая доза 225 мг вводится в разные места, что поможет минимизировать объем инъекции в каждое место. Поддозы могут быть поделены поровну (например, на 4 равные поддозы) или могут быть неравными (например, на 4 поддозы, две из которых вдвое больше других поддоз).

В некоторых вариантах реализации, число доз антитела, вводимых субъекту за курс лечения, может меняться в зависимости от, например, достижения сниженной частоты вазомоторного симптома и/или головной боли у субъекта. В некоторых вариантах реализации, вазомоторный симптом ассоциирован с формой головной боли (например, мигрени, хронической мигрени, эпизодической мигрени, другого типа головной боли и т.д.). Например, число доз, вводимых за курс лечения, может составлять, может составлять по меньшей мере, или могут составлять самое большее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, или 50. В некоторых случаях (например, в случаях, когда субъект имеет хроническую мигрень), лечение может проводиться без ограничений по времени. В некоторых случаях, лечение может быть неотложным, так чтобы субъекту для лечения вводили самое большее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 доз.

В некоторых вариантах реализации, доза (или поддоза) или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в данном документе, может быть составлена в виде жидкой композиции и введена (например, путем подкожной инъекции, путем внутривенной инъекции) субъекту. В таких случаях, объем жидкой композиции, содержащей антитело, может меняться в зависимости от, например, концентрации

антитела в жидкой композиции, желательной дозы антитела, и/или используемого пути введения. Например, объем жидкой композиции, содержащей антитело, описанное в данном документе, и введенной (например, путем инъекции, такой как, например, подкожная инъекция или внутривенная инъекция) субъекту, может иметь значение от 0,001 мл до 10,0 мл, от 0,01 мл до 5,0 мл, от 0,1 мл до 5 мл, от 0,1 мл до 3 мл, от 0,5 мл до 2,5 мл, или от 1 мл до 2,5 мл. Например, объем жидкой композиции, содержащей антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP), описанное в данном документе, и введенной (например, путем инъекции, такой как, например, подкожная инъекция или внутривенная инъекция) субъекту может составлять, может составлять по меньшей мере, может составлять менее чем, или могут составлять самое большее 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, или 10,0 мл.

В некоторых вариантах реализации, доза (или поддоза) или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в данном документе, может поставляться в предварительно наполненных емкостях, пригодных для введения антитела субъекту. Такие предварительно наполненные емкости могут быть предназначены для самовведения или для введения другим лицом. Например, доза (или поддоза) или количество антитела, описанные в данном документе, может поставляться в виде жидкой композиции в предварительно наполненных шприцах. В таких примерах, предварительно наполненные шприцы могут быть предназначены для самовведения или для введения другим лицом. В некоторых случаях, предварительно наполненные шприцы могут быть предназначены для подкожного введения и/или внутривенного введения.

В целях настоящего изобретения, требуемая доза антитела может зависеть от используемого антитела (или его композиций), типа и тяжести вазомоторного симптома, типа и тяжести головной боли (например, мигрени) или другого состояния, подлежащего лечению, от того, с профилактической или с терапевтической целью

вводится агент, предшествующей терапии, клинической истории пациента и отклика на агент, и мнения лечащего врача. Типично, клинический врач будет вводить антитело до достижения дозы, обеспечивающей желательный результат. Доза и/или частота могут меняться по ходу лечения.

5           Эмпирические соображения, такие как период полувыведения, обычно будут приниматься во внимание при определении дозы. Например, антитела, совместимые с иммунной системой человека, такие как гуманизированные антитела или полностью человеческие антитела, могут быть использованы для увеличения периода полувыведения антитела и для предотвращения атаки антитела со стороны иммунной  
10 системы хозяина. Частота введения может быть определена и откорректирована по ходу терапии, и обычно, но не обязательно, основана на лечении и/или подавлении и/или облегчении и/или задержке головной боли (например, мигрени) или другого состояния. Альтернативно, пролонгированное непрерывное высвобождение композиции антител может быть пригодным. Различные композиции и устройства для  
15 достижения пролонгированного высвобождения известны специалистам.

В одном варианте реализации, дозы антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в данном документе, могут быть определены эмпирически у индивидуумов, которые получают  
20 один или несколько приемов антитела. Индивидуумам дают постепенно возрастающие дозы антитела. Для оценки эффективности антитела может проводиться наблюдение за показателем болезни.

Введение антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального  
25 антагонистического антитела против CGRP) в соответствии со способами по настоящему изобретению может быть непрерывным или прерывистым, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, независимо от того, является цель введения терапевтической или профилактической, и других факторов, известных квалифицированным практикующим врачам. Введение антитела может быть по  
30 существу непрерывным на протяжении предварительно заданного периода времени, или может осуществляться в виде последовательности разделенных доз, например, до, во время, или после развития головной боли (например, мигрень); до; во время; до и после; во время и после; до и во время; или до, во время, и после развития головной

боли. Введение может осуществляться до, во время и/или после любого события, которое вероятно приведет к возникновению головной боли.

В некоторых вариантах реализации может присутствовать несколько антител. Могут присутствовать по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять разных, или больше антител. В 5  
общем, эти антитела могут обладать комплементарными активностями, которые не оказывают отрицательного влияния друг на друга. Антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP),  
10 описанное в данном документе, также может использоваться в сочетании с другими антагонистами CGRP или антагонистами рецепторов CGRP. Например, могут быть использованы один или несколько из следующих антагонистов CGRP: антисмысловая молекула, нацеленная на CGRP (включая антисмысловую молекулу, нацеленную на нуклеиновую кислоту, кодирующую CGRP), соединение, ингибирующее CGRP,  
15 структурный аналог CGRP, доминантно-негативную мутацию рецептора CGRP, которая связывает CGRP, и антитело против рецептора CGRP. Антитело также может использоваться в сочетании с другими агентами, усиливающими и/или дополняющими эффективность агентов.

Диагностика или оценка головной боли хорошо известна специалистам в 20  
данной области техники. Оценка может проводиться на основании субъективных показателей, таких как характеристика симптомов пациентом. Например, мигрень может быть диагностирована на основании следующих критериев: 1) эпизодические приступы головной боли, длящиеся от 4 до 72 часов; 2) с двумя из следующих симптомов: односторонняя боль, пульсация, обострение при движении, и боль 25  
умеренная или тяжелая по интенсивности; и 3) один из следующих симптомов: тошнота или рвота, и фотофобия или фонофобия. Goadsby et al., N. Engl. J. Med. 346:257-270, 2002. В некоторых вариантах реализации, оценка головной боли (например, мигрени) может осуществляться по количеству часов головной боли, как описано в других разделах данного документа. Например, оценка головной боли  
30 (например, мигрени) может осуществляться по суточному количеству часов головной боли, недельному количеству часов головной боли, месячному количеству часов головной боли и/или годовому количеству часов головной боли. В некоторых случаях, количеству часов головной боли может указываться субъектом.

Эффективность лечения может оцениваться способами, хорошо известными специалистам. Например, может оцениваться купирование боли. Соответственно, в некоторых вариантах реализации, купирование боли субъективно определяется через 1, 2, или несколько часов после введения антитела против CGRP. В некоторых вариантах реализации, частота приступов головной боли субъективно определяется после введения антитела против CGRP.

В некоторых вариантах реализации, способ лечения или снижения частоты головной боли у субъекта, как описано в данном документе, может снижать частоту головной боли после разового введения антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в данном документе, в течение длительного периода времени. Например, частота головной боли может снижаться на протяжении по меньшей мере 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или больше дней после разового введения.

В некоторых вариантах реализации, способ лечения или снижения частоты головной боли у субъекта, как описано в данном документе, может уменьшать число часов головной боли, испытываемой субъектом, по сравнению с уровнем до введения, после введения субъекту одной или нескольких доз антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в данном документе. Например, суточное количество часов головной боли, испытываемой субъектом, после введения субъекту одной или нескольких доз антитела, может быть уменьшено на 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов головной боли по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения. В некоторых случаях, суточное количество часов головной боли, испытываемой субъектом, после введения субъекту одной или нескольких доз антитела, может быть уменьшено на 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % или больше, по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения. В другом примере, недельное количество часов головной боли, испытываемой субъектом, может быть уменьшено после введения субъекту одной или нескольких доз антитела на 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или больше часов

головной боли по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения. В некоторых случаях, недельное количество часов головной боли, испытываемой субъектом, может быть уменьшено после введения субъекту одной или нескольких доз антитела на 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % или больше, по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения. В другом примере, месячное количество часов головной боли, испытываемой субъектом, может быть уменьшено после введения субъекту одной или нескольких доз антитела на 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125 или больше часов головной боли по сравнению с уровнем до введения. В некоторых случаях, недельное количество часов головной боли, испытываемой субъектом, может быть уменьшено после введения субъекту одной или нескольких доз антитела на 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % или больше, по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения.

В некоторых вариантах реализации, способ лечения или снижения частоты головной боли у субъекта, как описано в данном документе, может уменьшать число дней головной боли, испытываемой субъектом, по сравнению с уровнем до введения, после введения субъекту одной или нескольких доз антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в данном документе. Например, недельное количество дней головной боли, испытываемой субъектом, может быть уменьшено после введения субъекту одной или нескольких доз антитела на 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, или 7 дней головной боли по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения. В некоторых случаях, недельное количество дней головной боли, испытываемой субъектом, может быть уменьшено после введения субъекту одной или нескольких доз антитела на 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % или больше, по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения. В другом примере, месячное количество дней головной боли, испытываемой субъектом, может быть уменьшено после введения субъекту одной или нескольких доз антитела на 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или больше дней головной боли, по сравнению с уровнем до введения.

В некоторых вариантах реализации, способ может включать введение субъекту одного или нескольких дополнительных агентов одновременно или последовательно с антителом (например, моноклональным антителом, которое модулирует путь CGRP, антагонистическим антителом против CGRP, моноклональным антагонистическим антителом против CGRP). В некоторых вариантах реализации, дополнительный агент может быть лекарственным препаратом против головной боли, таким как приведенный в примере лекарственный препарат против головной боли (например, агонисты 5-HT<sub>1</sub>, триптаны, алкалоиды спорыньи, опиаты, β-адренергические антагонисты, NSAID) описанные в любом месте данного документа. В некоторых вариантах реализации, терапевтический эффект может быть увеличен по сравнению с использованием антитела или одного или нескольких дополнительных агентов по отдельности. Соответственно, может быть достигнут синергический эффект между антителом и одним или несколькими дополнительными агентами. В некоторых вариантах реализации, один или несколько дополнительных агентов могут приниматься субъектом профилактически.

#### В. Антагонистические антитела против CGRP

В некоторых вариантах реализации, в способах по изобретению используется антитело, которое может быть антагонистическим антителом против CGRP. Антагонистическое антитело против CGRP может относиться к любой молекуле антитела, которая блокирует, подавляет или снижает (в том числе значительно) биологическую активность CGRP, включая метаболические пути, медируемые сигнализацией CGRP, такие как связывание рецептора и/или вызывание клеточного ответа на CGRP.

Антагонистические антитело против CGRP может проявлять любую одну или несколько из следующих характеристик: (a) связывание с CGRP; (b) блокирование связывания CGRP с его рецептором (рецепторами); (c) блокирование или снижение активации рецептора CGRP (включая активацию cAMP); (d) ингибирование биологической активности CGRP или метаболических путей, медируемых сигнальной функцией CGRP; (e) предотвращение, облегчение или исцеления любого аспекта головной боли (например, мигрени); (f) увеличение клиренса CGRP; и (g) ингибирование (снижение) синтеза CGRP, продуцирования или высвобождения. Антагонистические антитела против CGRP известны специалистам. См., например, Tan

et al., Clin. Sci. (Lond). 89:565-73, 1995; Sigma (Миссури, США), Номер продукта C7113 (клон №4901); Plourde et al., Peptides 14:1225-1229, 1993.

В некоторых вариантах реализации, антитело взаимодействует с CGRP, ингибируя CGRP и/или путь CGRP, включая метаболические пути, медируемые 5 сигнальной функцией CGRP. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP распознает человеческий CGRP. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP связывается с обоими из человеческих  $\alpha$ -CGRP и  $\beta$ -CGRP. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP связывается с человеческим и крысиным 10 CGRP. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP связывает С-концевой фрагмент, содержащий аминокислоты 25-37 CGRP. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP связывает С-концевой эпитоп в пределах аминокислот 25-37 CGRP.

Антитела, пригодные для использования по настоящему изобретению, могут 15 охватывать моноклональные антитела, поликлональные антитела, фрагменты антител (например, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc и т.д.), химерные антитела, биспецифические антитела, гетероконъюгированные антитела, одноцепочечные (ScFv), их мутанты, гибридные белки, содержащие участок, являющийся антителом (например, доменным антителом), гуманизированные антитела, и любые другие молекулы иммуноглобулина 20 с модифицированной конфигурацией, содержащие сайт распознавания антигена требуемой специфичности, включая гликозилированные варианты антител, аминокислотные последовательности вариантов антител, и ковалентно модифицированные антитела. Антитела может быть мышинными, крысиными, человеческими, или иметь любое другое происхождение (включая химерные или 25 гуманизированные антитела).

В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP является гуманизированным. В некоторых вариантах реализации, антитело является человеческим. В некоторых вариантах 30 реализации, антагонистическое антитело против CGRP представляет собой антитело G1 (как описано в данном документе). В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP включает один или несколько CDR (гипервариабельных участков) например, один, два, три, четыре, пять или, в некоторых

вариантах реализации, все шесть CDR) антитела G1 или вариантов G1, представленных в Таблице 6. В других вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP содержит аминокислотную последовательность варибельного участка тяжелой цепи, представленную на Фигуре 5 (SEQ ID NO:1), и аминокислотную последовательность варибельного участка легкой цепи, представленную на Фигуре 5 (SEQ ID NO:2).

В некоторых вариантах реализации, антитело содержит варибельный участок легкой цепи (LCVR) и варибельный участок тяжелой цепи (HCVR), выбранны из группы, состоящей из: (a) LCVR17 (SEQ ID NO: 58) и HCVR22 (SEQ ID NO: 59); (b) LCVR18 (SEQ ID NO: 60) и HCVR23 (SEQ ID NO: 61); (c) LCVR19 (SEQ ID NO: 62) и HCVR24 (SEQ ID NO: 63); (d) LCVR20 (SEQ ID NO: 64) и HCVR25 (SEQ ID NO: 65); (e) LCVR21 (SEQ ID NO: 66) и HCVR26 (SEQ ID NO: 67); (f) LCVR27 (SEQ ID NO: 68) и HCVR28 (SEQ ID NO: 69); (g) LCVR29 (SEQ ID NO: 70) и HCVR30 (SEQ ID NO: 71); (h) LCVR31 (SEQ ID NO: 72) и HCVR32 (SEQ ID NO: 73); (i) LCVR33 (SEQ ID NO: 74) и HCVR34 (SEQ ID NO: 75); (j) LCVR35 (SEQ ID NO: 76) и HCVR36 (SEQ ID NO: 77); и (k) LCVR37 (SEQ ID NO: 78) и HCVR38 (SEQ ID NO: 79). Последовательности этих областей представлены в данном документе. Другие примеры антител описаны в US20110305711, US20120294802, US20120294797 и US20100172895, которые включены в данный документ в качестве ссылок.

В некоторых вариантах реализации, антитело содержит модифицированную константную область, такую как константная область, являющаяся иммунологически инертной, описанная в данном документе. В некоторых вариантах реализации, константная область является модифицированной, как описано в *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624; заявке РСТ № РСТ/GB99/01441; и/или патентной заявке Великобритании № 9809951.8. В других вариантах реализации, антитело содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG2, содержащую следующие мутации: A330P331 на S330S331 (нумерация аминокислот в соответствии с последовательностью IgG2 дикого типа). *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624. В некоторых вариантах реализации, антитело содержит константную область IgG4, содержащую следующие мутации: E233F234L235 на P233V234A235. В других вариантах реализации, константная область агликозилирована для N-связанного гликозилирования. В некоторых вариантах реализации, константная область агликозилирована для N-связанного гликозилирования путем мутации остатка

присоединения олигосахарида (такого как Asn297) и/или фланкирующих остатков, являющихся частью последовательности распознавания N-гликозилирования в константной области. В некоторых вариантах реализации, константная область агликозилирована для N-связанного гликозилирования. Константная область может  
5 быть агликозилирована для N-связанного гликозилирования ферментативно или путем экспрессии в дефицитной по гликозилированию клетке-хозяине.

Аффинность связывания ( $K_D$ ) антагонистического антитела против CGRP с CGRP (таким как человеческий  $\alpha$ -CGRP) может составлять от около 0,02 до около 200 нМ. В некоторых вариантах реализации, аффинность связывания имеет любое  
10 значение из около 200 нМ, около 100 нМ, около 50 нМ, около 10 нМ, около 1 нМ, около 500 пМ, около 100 пМ, около 60 пМ, около 50 пМ, около 20 пМ, около 15 пМ, около 10 пМ, около 5 пМ, или около 2 пМ. В некоторых вариантах реализации, аффинность связывания имеет значение меньше любой величины из около 250 нМ, около 200 нМ, около 100 нМ, около 50 нМ, около 10 нМ, около 1 нМ, около 500 пМ,  
15 около 100 пМ, или около 50 пМ.

Одним из способов определения аффинности связывания антител с CGRP является измерение аффинности связывания моnofункциональных Fab-фрагментов антитела. Для получения моnofункциональных Fab-фрагментов, антитело (например, IgG) может быть гидролизовано папаином или экспрессировано рекомбинантными  
20 методами. Аффинность Fab-фрагмента антитела против CGRP может быть определена методом поверхностного плазмонного резонанса (система поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore3000™, Biacore, INC, Piscataway NJ), оснащенная сенсорными чипами с предварительно иммобилизованным стрептавидином (SA), с использованием HBS-EP подвижного буфера (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl, 3 mM  
25 ЭДТА, 0,005 % об./об. Surfactant P20). Биотинилированный человеческий CGRP (или любой другой CGRP) может быть разбавлен буфером HBS-EP до концентрации менее 0,5 мкг/мл и пропускаться путем инъекции по индивидуальным каналам чипа с использованием различных времен контакта для получения двух диапазонов плотности антигена - 50-200 единиц отклика (RU) для детальных кинетических исследований или  
30 800-1000 RU для скрининговых анализов. Исследования регенерации показали, что 25 mM NaOH в 25 % об./об. этаноле эффективно удаляет связанный Fab, при сохранении активности CGRP на чипе на протяжении более 200 инъекций. Типично, серийные разбавления (в диапазоне концентраций 0,1-10x, расчетное значение  $K_D$ ) очищенных

образцов Fab вводят на 1 мин при расходе 100  $\mu$ л/минуту и наблюдают диссоциацию в течение до 2 часов. Концентрации белков Fab определяют методами ИФА и/или электрофорезом SDS-PAGE (полиакриламидный гель с добавкой ДСН) с использованием известной концентрации Fab (определенной по анализу аминокислот) в качестве стандарта. Кинетические константы ассоциации ( $k_{on}$ ) и константы диссоциации ( $k_{off}$ ) получают одновременно путем аппроксимации данных глобально с использованием 1:1 модели связывания Лэнгмюра (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) с помощью программы BIAevaluation. Значения равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывают как  $k_{off}/k_{on}$ . Этот протокол пригоден для использования при определении аффинности связывания антитела с любым CGRP, включая человеческий CGRP, CGRP других млекопитающих (такие как мышинный CGRP, крысиный CGRP, CGRP приматов), а также разных форм CGRP (таких как  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы). Аффинность связывания антитела обычно измеряют при 25  $^{\circ}$ C, но она также может быть измерена при 37  $^{\circ}$ C.

Антитела, включая антагонистические антитела против CGRP, могут быть получены любым способом, известным специалистам. Путь введения и график иммунизации животного-хозяина обычно соответствуют принятым и обычным методикам стимуляции антителом и продуцирования, как дополнительно описано в данном документе. Общие методики продуцирования человеческих и мышинных антител известны специалистам и описаны в данном документе.

Предусматривается, что любое млекопитающее-субъект, включая людей, или его антитело-продуцирующие клетки могут быть с помощью определенных манипуляций использованы в качестве основы для продуцирования гибридных клеточных линий млекопитающего, включая человека. Типично, животное-хозяина инокулируют интраперитонеально, внутримышечно, орально, подкожно, интраплантарно и/или интрадермально определенным количеством иммуногена, включая способы, описанные в данном документе.

Гибридомы могут быть получены из лимфоцитов и иммортализованных клеток миеломы с использованием общей методики гибридизации соматических клеток Kohler, B. and Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497 или модифицированной в соответствии с Buck, D. W., et al., *In vitro*, 18:377-381 (1982). Для гибридизации могут быть использованы доступные линии миеломы, включая, без ограничений, X63-Ag8.653 и предлагаемые Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA. В

общем, методика предусматривает слияние клеток миеломы и лимфоидных клеток с использованием вещества, стимулирующего слияние, такого как гликоль, или электрических средств, хорошо известных квалифицированным специалистам в данной области техники. После слияния, клетки отделяют от среды для слияния и  
5 выращивают в селективной питательной среде, такой как среда с гипоксантином-аминоптерином-тимидином (НАТ), для устранения негибридизованных родительских клеток. Любая из сред, описанных в данном документе, с добавкой сыворотки или без нее, может быть использована для культивации гибридом, которые секретируют  
10 моноклональные антитела. В качестве другой альтернативы методу слияния клеток, иммортализованные с помощью EBV (вирус Эпштейна-Барр) В-клетки могут быть использованы для продуцирования моноклональных антител (например, моноклональных антител против CGRP) по данному изобретению. Гибридомы  
растягивают и субклонировать, при необходимости, и супернатанты анализируют на активность по отношению к иммуногену с помощью обычных процедур  
15 иммунологического анализа (например, радиоиммуноанализ, ферментный иммунологический анализ, или флуоресцентный иммунологический анализ).

Гибридомы, которые могут быть использованы в качестве источника антител, охватывают все производные, потомство клеток родительских гибридом, которые продуцируют моноклональные антитела, специфические к CGRP, или их часть.

20 Гибридомы, продуцирующие такие антитела, могут выращиваться *in vitro* или *in vivo* с использованием известных процедур. Моноклональные антитела могут быть выделены из питательных сред или жидкостей организма с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как осаждение с помощью сульфата аммония, гель-электрофорез, диализ, хроматография, и ультрафильтрация, при  
25 необходимости. Нежелательная активность, если она присутствует, могут быть устранена, например, путем пропускания препарата над адсорбентами, состоящими из иммуногена, присоединенного к твердой фазе, и элюирования или высвобождения желательного антитела от иммуногена. Иммунизация животного-хозяина с помощью человеческого CGRP, или фрагмента, содержащего целевую аминокислотную  
30 последовательность, конъюгированную с белком, являющимся иммуногенным для вида, подлежащего иммунизации, например, гемоцианин моллюска фиссуреллы, сывороточный альбумин, бычий тиреоглобулин, или ингибитор соевого трипсина, с использованием бифункционального или дериватирующего агента, например,

малеимидобензоилсульфосукцинимидного сложного эфира (конъюгация через цистеиновые остатки), N-гидроксисукцинимид (через лизиновые остатки), глутаральдегида, янтарного альдегида, SOCl<sub>2</sub>, или R1N=C=NR, где R и R1 обозначают разные алкильные группы, может дать популяцию антител (например, 5 моноклональных антител).

При необходимости, антитело (например, моноклональное или поликлональное антагонистическое антитело против CGRP), представляющее интерес, может быть секвенировано и полинуклеотидная последовательность может затем быть клонировано в вектор для экспрессии или размножения. Последовательность, 10 кодирующая антитело, представляющее интерес, может поддерживаться в векторе в клетке-хозяине, и клетка-хозяин может быть затем размножена и заморожена для последующего использования. В альтернативе, полинуклеотидная последовательность может быть использована для генетической манипуляции с целью “гуманизации” антитела или для улучшения аффинности, или других характеристик антитела. 15 Например, константная область может быть генетически модифицирована для придания большего сходства с человеческими константными областями во избежание иммунного ответа, если антитело используется в клинических испытаниях и лечении людей. Может быть желательным проведение генетических манипуляций с последовательностью антитела для получения большей аффинности к CGRP и 20 большей эффективности ингибирования CGRP. Квалифицированному специалисту в данной области техники будет понятно, что можно выполнить одно или несколько изменений полинуклеотида в антагонистическом антителе против CGRP при сохранении его связывающей способности с CGRP.

Гуманизация моноклонального антитела может включать четыре общих стадии. 25 Они представляют собой: (1) определение нуклеотидной и предсказанной аминокислотной последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей исходного антитела; (2) проектирование гуманизованного антитела, т.е., определение того, какой каркасный участок антитела использовать в процессе гуманизации; (3) методология/методики собственно гуманизации; и (4) трансфекция и 30 экспрессия гуманизованного антитела. См., например, патентах США №№ 4816567; 5807715; 5866692; 6331415; 5530101; 5693761; 5693762; 5585089; и 6180370.

Был описан ряд “гуманизованных” молекул антитела, содержащих антигенсвязывающий сайт, выделенный из не принадлежащего человеку

иммуноглобулина, включая химерные антитела, имеющие V-области грызунов или модифицированные V-области грызунов и их ассоциированных участков, определяющих комплементарность (CDR), слитых с человеческими константными доменами. См., например, Winter et al. *Nature* 349:293-299 (1991), Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. *J Immunol.* 138:4534-4538 (1987), и Brown et al. *Cancer Res.* 47:3577-3583 (1987). Другие ссылки описывают CDR грызунов, привитые к человеческому несущему каркасному участку (FR) перед слиянием с соответствующим константным доменом человеческого антитела. См., например, Riechmann et al. *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeven et al. *Science* 239:1534-1536 (1988), и Jones et al. *Nature* 321:522-525 (1986). Другая ссылка описывает CDR грызуна, поддерживаемые рекомбинантно сконструированным каркасными участками грызуна. См., например, европейскую патентную публикацию № 0519596. Такие “гуманизированные” молекулы сконструированы для минимизации нежелательного иммунологического ответа на молекулы антитела грызуна против человека, который ограничивает продолжительность и эффективность терапевтического применения таких веществ у реципиентов-людей. Например, константная область антитела может быть модифицирована таким образом, чтобы она была иммунологически инертной (например, не инициировала лизис комплемента). См., например публикацию РСТ № РСТ/GB99/01441; патентную заявку Великобритании № 9809951.8. Другие способы гуманизации антител, которые также могут быть использованы, раскрыты в Daugherty et al., *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476 (1991) и в патентах США №№ 6180377; 6054297; 5997867; 5866692; 6210671; и 6350861; и в публикации РСТ № WO 01/27160.

В другой альтернативе, полностью человеческие антитела могут быть получены при использовании коммерчески доступных мышей, которые были модифицированы для экспрессии специфических белков человеческих иммуноглобулинов. Трансгенные животные, предназначенные для продуцирования более желательного (например, полностью человеческих антител) или более сильного иммунного ответа, также могут быть использованы для получения гуманизированных или человеческих антител. Примерами такой технологии являются Xenomouse™ фирмы Abgenix, Inc. (Fremont, CA) и HuMAb-Mouse® и TC Mouse™ фирмы Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

В альтернативе, антитела могут быть получены рекомбинантными методами и экспрессированы с использованием любого способа, известного специалистам. В другой альтернативе, антитела могут быть получены рекомбинантно по технологии

фагового дисплея. См., например, патентах США №№ 5565332; 5580717; 5733743; и 6265150; и Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994). Альтернативно, технология фагового дисплея (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) может быть использована для продуцирования человеческих антител и фрагментов антител *in vitro*,  
5 из генных репертуаров переменного (V) домена иммуноглобулина от неиммунизированных доноров. В соответствии с этой методикой, гены V-домена антитела клонируют в рамке в ген основного или минорного белка оболочки нитевидного бактериофага, такого как M13 или fd, и представляются как функциональные фрагменты антител на поверхности фаговой частицы. Поскольку  
10 нитевидная частица содержит одноцепочечную копию ДНК фагового генома, селекция на основе функциональных свойств антитела также приводит к селекции гена, кодирующего антитело, демонстрирующее такие свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые свойства В-клетки. Фаговый дисплей может проводиться в различных форматах; обзор приведен, например, в Johnson, Kevin S. and Chiswell,  
15 David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Для фагового дисплея могут быть использованы несколько источников сегментов V-гена. Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) выделили широкий спектр антител против оксазолонна из небольшой случайной комбинаторной библиотеки V-генов, выделенных из селезенок иммунизированных мышей. Репертуар V-генов от неиммунизированных человеческих  
20 доноров может быть сконструирован, и антитела к широкому спектру антигенов (включая аутоантигены) могут быть выделены по существу согласно методикам, описанным Mark et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), или Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). При природном иммунном ответе, гены антитела накапливают мутации с высокой скоростью (соматическая гипермутация). Некоторые из вносимых  
25 изменений будут придавать более высокую аффинность, и В-клетки, представляющие высокоаффинный поверхностный иммуноглобулин, предпочтительно реплицируются и дифференцируются при последующей антигенной стимуляции. Этот природный процесс можно имитировать путем использования методики, известной как “перетасовка цепи” (Marks, et al., Bio/Technol. 10:779-783 (1992)). В этом способе,  
30 аффинность “первичных” человеческих антител, полученных с помощью фагового дисплея, может быть улучшена путем последовательной замены генов V-областей тяжелой и легкой цепей на репертуары природных вариантов (репертуары) генов V-домена, полученных от неиммунизированных доноров. Эта методика позволяет

5 продуцировать антитела и фрагменты антител с аффинностями в диапазоне пМ-нМ. Стратегия получения очень больших репертуаров фаговых антител (также известных как “мать всех библиотек”) была описана Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21:2265-2266 (1993). Перетасовка генов также может быть использована для получения

10 человеческих антител из антител грызунов, когда человеческое антитело имеет аффинности и специфичности, схожие с исходным антителом грызуна. В соответствии с этим способом, который также называется “импринтинг эпитопа”, ген V-домена тяжелой или легкой цепей антител грызунов, полученных методом фагового дисплея, заменяют на репертуар генов человеческого V-домена, создавая химеры грызун-человек. Селекция по антигену приводит к выделению человеческих варибельных областей, способных восстанавливать функциональный антигенсвязывающий сайт, т.е., эпитоп определяет (впечатывает) выбор партнера. При повторении процесса для замены оставшегося V-домена грызуна получают человеческое антитело (см. публикацию РСТ № WO 93/06213, опубликованную 1 апреля 1993 г.). В отличие от

15 традиционной гуманизации антител грызунов методом трансплантации CDR, эта методика обеспечивает получение полностью человеческих антител, которые не имеют остатков каркасных или CDR-участков грызуна.

Понятно, что хотя приведенное выше описание относится к гуманизированным антителам, рассмотренные общие принципы применимы к направленной модификации

20 антител, предназначенных для использования, например, для собак, кошек, приматов, лошадей и крупного рогатого скота. Дополнительно понятно, что один или несколько аспектов гуманизации антител, описанных в данном документе, могут быть скомбинированы, например, трансплантация CDR, мутация каркасной области и мутация CDR.

25 Антитела могут быть получены рекомбинантными методами путем выделения сначала антител и антитело-продуцирующих клеток у животных-хозяев, получения генной последовательности, и использования генной последовательности для рекомбинантной экспрессии антитела в клетках-хозяевах (например, клетках CHO). Другой способ, который может быть использован, заключается в экспрессии

30 последовательности антитела в растениях (например, табака) или трансгенном молоке. Способы рекомбинантной экспрессии антител в растениях или молоке раскрыты в литературе. См., например, Peeters, et al. Vaccine 19:2756 (2001); Lonberg, N. and D. Huszar Int.Rev.Immunol 13:65 (1995); и Pollock, et al., J Immunol Methods 231:147(1999).

Способы получения производных антител, например, гуманизированных, одноцепочечных и т.д., известны специалистам.

Иммунологические анализы и сортировка методами проточной цитометрии, такими как активируемая флуоресценцией сортировка клеток (FACS) также могут быть  
5 использованы для выделения антител, специфических по отношению к CGRP.

Антитела могут быть связаны с различными носителями. Носители могут быть активными и/или инертными. Примеры носителей включают полипропилен, полистирол, полиэтилен, декстран, нейлон, амилазы, стекло, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, агарозы и магнетит. Носитель по  
10 природе может быть растворимым или нерастворимым. Квалифицированные специалисты в данной области техники знают другие пригодные носители для связывания антител, или могут определить такие, используя рутинные эксперименты. В некоторых вариантах реализации, носитель содержит фрагмент, нацеленный на миокард.

15 ДНК, кодирующая моноклональные антитела, легко выделяется и секвенируется с использованием обычных процедур (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи моноклональных антител). Клетки гибридом служат предпочтительным источником такой ДНК. После выделения, ДНК может быть  
20 помещена в экспрессионные вектора (такие как экспрессионные вектора, раскрытые в публикации PCT № WO 87/04462), которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьян, клетки яичника китайского хомячка (СНО), или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулина, для обеспечения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-  
25 хозяевах. См., например, публикацию PCT № WO 87/04462. ДНК также может быть модифицирована, например, путем замещения кодирующей последовательности на константные домены человеческих тяжелой и легкой цепей вместо гомологичных мышинных последовательностей, Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851 (1984), или путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности  
30 иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности полипептида, не являющегося иммуноглобулином. Таким способом получают “химерные” или “гибридные” антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к любому моноклональному антителу против CGRP, описанному в данном документе.

Антитела (например, антагонистические антитела против CGRP) и полипептиды, полученные из антител, могут быть идентифицированы или охарактеризованы с использованием способов, известных специалистам, в которых детектируется и/или измеряется снижение, ослабление или нейтрализация биологической активности CGRP. Например, антагонистическое антитело против CGRP также может быть идентифицировано путем инкубации агента-кандидата с CGRP и контроля любой одной или нескольких из следующих характеристик: (а) связывание с CGRP; (b) блокирование связывания CGRP с его рецептором (рецепторами); (с) блокирование или снижение активации рецептора CGRP (включая активацию сAMP); (d) ингибирование биологической активности CGRP или метаболических путей, медируемых сигнальной функцией CGRP; (е) предотвращение, облегчение или исцеления любого аспекта головной боли (например, мигрени); (f) увеличение клиренса CGRP; и (g) ингибирование (снижение) синтеза CGRP, продуцирования или высвобождения. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP или полипептид идентифицируют путем инкубации агента-кандидата с CGRP и контроля связывания и/или сопутствующего снижения или нейтрализации биологической активности CGRP. Анализ связывания может проводиться с очищенным полипептидом (полипептидами) CGRP, или с клетками, экспрессирующими в природных условиях, или трансфицированными для обеспечения экспрессии, полипептида (полипептидов) CGRP. В одном варианте реализации, анализ связывания представляет собой конкурентный анализ связывания, в котором оценивается способность антитела-кандидата конкурировать с известным антагонистом CGRP за связывание с CGRP. Анализ может проводиться в различных форматах, включая формат ИФА. В других вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP идентифицируют путем инкубации агента-кандидата с CGRP и контроля связывания и сопутствующего ингибирования активации рецептора CGRP, экспрессируемого на поверхности клетки.

После первичной идентификации, активность антитела-кандидата (например, антагонистического антитела против CGRP) может быть дополнительно подтверждена и уточнена с помощью биоанализов, предназначенных для тестирования целевых биологических активностей. Альтернативно, биоанализы могут быть использованы для прямого скрининга кандидатов. Например, CGRP промотирует ряд измеримых изменений в чувствительных клетках. Они включают, без ограничений, стимуляцию

cAMP в клетках (например, клетках SK-N-MC). Антагонистическая активность также может быть измерена с помощью животных моделей, таких как измерение вазодилатации кожи, индуцируемой стимуляцией подкожного нерва крысы. Escott et al., *Br. J. Pharmacol.* 110: 772-776, 1993. Животные модели головных болей (таких как мигрень) могут быть дополнительно использованы для тестирования эффективности антагонистических антител или полипептидов. Reuter, et al., *Functional Neurology* (15) Suppl,3, 2000. Некоторые из способов идентификации и характеристики антагонистического антитела против CGRP или полипептида описаны детально в Примерах.

10 Антитела, включая антагонистические антитела против CGRP, могут быть охарактеризованы с использованием способов, хорошо известными специалистам. Например, один способ заключается в идентификации эпитопа, с которым оно связывается, или “картировании эпитопа”. Существует много известных специалистам способов картирования и характеристики расположения эпитопов в белках, включая

15 определение кристаллической структуры комплекса антитело-антиген, конкурентные анализы, анализы экспрессии генного фрагмента, и анализы с использованием синтетических пептидов, как описано, например, в Главе 11, Harlow and Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. В дополнительном примере, картирование эпитопа может быть

20 использовано для определения последовательности, с которой связывается антагонистическое антитело против CGRP. Картирование эпитопа коммерчески доступно из различных источников, например, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands). Эпитоп может быть линейным эпитопом, т.е., состоять из одного отрезка последовательности аминокислот, или конформационным эпитопом,

25 образованным в результате трехмерных взаимодействий аминокислот, которые не обязательно будут входить в состав одного отрезка. Пептиды различной длины (например, длиной по меньшей мере 4-6 аминокислот) могут быть выделены или синтезированы (например, рекомбинантно) и использованы в анализах связывания с антагонистическим антителом против CGRP. В другом примере, эпитоп, с которым

30 связывается антагонистическое антитело против CGRP, может быть определен с помощью системного скрининга путем использования перекрывающихся пептидов, полученных из последовательности CGRP, и определения связывания с антагонистическим антителом против CGRP. В соответствии с анализами экспрессии

генных фрагментов, открытая рамка считывания, кодирующая CGRP, фрагментируется или случайным образом, или с помощью специфических генетических конструкций, и определяется реакционная способность экспрессируемых фрагментов CGRP по отношению к тестируемому антителу. Генные фрагменты могут, например, быть  
5 получены методом ПЦР и затем транскрибированы и транслированы в белок *in vitro*, в присутствии радиоактивных аминокислот. Связывание антитела с радиоактивно мечеными фрагментами CGRP затем определяют методом иммунопреципитации и электрофореза на геле. Определенные эпитопы также могут быть идентифицированы путем использования больших библиотек случайных пептидных последовательностей,  
10 представляемых на поверхности фаговых частиц (фаговые библиотеки). Альтернативно, определенная библиотека перекрывающихся пептидных фрагментов может быть протестирована на связывание с тестируемым антителом с помощью простых анализов связывания. В дополнительном примере, мутагенез антигенсвязывающего домена, эксперименты с обменом доменами и сканирующий  
15 аланином мутагенез могут быть проведены для идентификации остатков, требуемых, достаточных и/или необходимых для связывания эпитопа. Например, эксперименты с обменом доменами могут быть проведены с использованием мутантного CGRP, в котором различные фрагменты полипептида CGRP замещаются (обмениваются) на последовательности из близкородственного, но антигенно отличного белка (такого как  
20 другой член семейства белка нейротрофина). С помощью анализа связывания антитела с мутантным CGRP, можно оценить важность конкретного фрагмента CGRP для связывания антитела.

Еще один способ, который может быть использован для характеристики антитела, включая антагонистическое антитело против CGRP, заключается в  
25 использовании конкурентных анализов с другими антителами, про которые известно, что они связываются с этим же антигеном, т.е., различными фрагментами CGRP, для определения того, связывается ли антагонистическое антитело против CGRP с тем же самым эпитопом, что и другие антитела. Конкурентные анализы хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области техники.

30 Экспрессионный вектор может быть использован для направления экспрессии антитела, включая антагонистическое антитело против CGRP. Квалифицированный специалист в данной области техники знаком с введением экспрессионных векторов для обеспечения экспрессии экзогенного белка *in vivo*. См., например, патенты США №

6436908; 6413942; и 6376471. Введение экспрессионных векторов включает локальное или системное введение, включая инъекцию, оральное введение, введение с помощью генной пушки или катетера, и местное введение. В другом варианте реализации, экспрессионный вектор вводят напрямую в симпатический ствол или ганглий, или в коронарную артерию, предсердие, желудочек или перикард.

Также может быть использована целевая доставка терапевтических композиций, содержащих экспрессионный вектор, или субгеномные полинуклеотиды. Методики рецептор-медируемой доставки ДНК описаны, например, в Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Терапевтические композиции, содержащие полинуклеотид, вводят в диапазоне от около 100 нг до около 200 мг ДНК для локального введения по протоколу генной терапии. Также могут быть использованы по протоколу генной терапии диапазоны концентраций от около 500 нг до около 50 мг, от около 1 мкг до около 2 мг, около 5 мкг до около 500 мкг, и около 20 мкг до около 100 мкг ДНК. Терапевтические полинуклеотиды и полипептиды могут быть доставлены с использованием носителей для генной доставки. Носитель для доставки генов может иметь вирусное или невирусное происхождение (см. в общем, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; и Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148). Экспрессия таких кодирующих последовательностей может быть индуцирована с помощью эндогенных принадлежащих млекопитающим или гетерологичных промоторов. Экспрессия кодирующей последовательности может быть конститутивной или регулируемой.

Вектора на основе вирусов для доставки желательного полинуклеотида и экспрессии в желательной клетке хорошо известны специалистам. Типичные примеры носителей на основе вирусов включают, без ограничений, рекомбинантные ретровирусы (см., например, публикации PCT №№ WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; патенты США №5 219740 и 4777127; патент Великобритании № 2200651; и патент EP № 0345242), вектора на основе альфавируса (например, вектора на основе вируса Sindbis, вируса леса Семлики (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), вируса реки Росс (ATCC VR-373; ATCC

VR-1246) и вируса венесуэльского лошадиного энцефалита (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), и вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (см., например, публикации РСТ №№ WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 и WO 95/00655). Также могут быть использовано  
5 введение ДНК, полученной из инактивированного аденовируса, как описано в Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.

Также могут быть использованы невирусные носители для доставки и способы, включая, без ограничений, поликонденсированные ДНК, связанные или не связанные с  
10 отдельно взятым инактивированным аденовирусом (см., например, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); связанные с лигандами ДНК (см., например, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); клетки-носители для доставки в эукариотические клетки (см., например, патент США № 5814482; публикации РСТ № WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; и WO 97/42338) и нейтрализацию ядерного заряда или слияние с  
15 клеточными мембранами. Также могут быть использованы "голые" ДНК. Типичные примеры способов введения "голых" ДНК описаны в публикации РСТ № WO 90/11092 и патенте США № 5580859. Липосомы, которые могут выступать в качестве носителей для доставки генов, описаны в патенте США № 5422120; публикациях РСТ № WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; и EP 0524968. Дополнительные подходы описаны в Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411, и в Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci.  
20 (1994) 91:1581.

#### С. Антитело G1 и связанные с ним антитела, полипептиды, полинуклеотиды, вектора и клетки-хозяева

Данное изобретение охватывает композиции, включая фармацевтические  
25 композиции, содержащие антитело G1 и его варианты, представленные в Таблице 6, или полипептид, полученный из антитела G1 и его вариантов, представленных в Таблице 6; и полинуклеотиды, содержащие последовательности, кодирующие G1 и его варианты или полипептид. В некоторых вариантах реализации, композиции содержат одно или несколько антител или полипептидов (которые могут быть или не быть  
30 антителом), которые связываются с CGRP, и/или один или несколько полинуклеотидов, содержащих последовательности, кодирующие одно или несколько антител или полипептидов, которые связываются с CGRP. Такие композиции могут

дополнительно содержать пригодные эксципиенты, такие как фармацевтически приемлемые эксципиенты, включая буферы, хорошо известные специалистам.

В некоторых вариантах реализации, антагонистические антитела против CGRP и полипептиды по изобретению обладают любой (одной или несколькими) из  
5 следующих характеристик: (a) связывание с CGRP; (b) блокирование связывания CGRP с его рецептором (рецепторами); (c) блокирование или снижение активации рецептора CGRP (включая активацию cAMP); (d) ингибирование биологической активности CGRP или метаболических путей, медируемых сигнальной функцией CGRP; (e)  
10 предотвращение, облегчение или исцеления любого аспекта головной боли (например, мигрени); (f) увеличение клиренса CGRP; и (g) ингибирование (снижение) синтеза CGRP, продуцирования или высвобождения.

В некоторых вариантах реализации, изобретение предусматривает любой из  
следующих вариантов, или композиции (включая фармацевтические композиции),  
содержащие любой из следующих вариантов: (a) антитело G1 или его варианты,  
15 представленные в Таблице 6; (b) фрагмент или область антитела G1 или его вариантов,  
представленных в Таблице 6; (c) легкую цепь антитела G1 или его вариантов,  
представленных в Таблице 6; (d) тяжелую цепь антитела G1 или его вариантов,  
представленных в Таблице 6; (e) одну или несколько переменных областей легкой  
цепи и/или тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6;  
20 (f) один или несколько CDR (один, два, три, четыре, пять или шесть CDR) антитела G1  
или его вариантов, представленных в Таблице 6; (g) CDR H3 тяжелой цепи антитела  
G1; (h) CDR L3 легкой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице  
6; (i) три CDR легкой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице  
6; (j) три CDR тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в  
25 Таблице 6; (k) три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи, антитела G1 или его  
вариантов, представленных в Таблице 6; и (l) антитело, содержащее любой вариант из  
описанных в пунктах (b) - (k). В некоторых вариантах реализации, изобретение также  
предусматривает полипептиды, содержащие любой один или несколько из  
вышеуказанных вариантов.

30 Участки CDR антитела G1 (включая CDR по системам Chothia и Kabat) схематично изображены на Фигуре 5. Определение участков CDR хорошо известно специалистам в данной области техники. Следует понимать, что в некоторых вариантах реализации, CDR могут быть комбинацией CDR по системам Kabat и

Chothia (также называемой "объединенные CDR" или "расширенные CDR"). В некоторых вариантах реализации, CDR представляют собой CDR по системе Kabat. В других вариантах реализации, CDR представляют собой CDR по системе Chothia. Другими словами, в вариантах реализации с более чем одним CDR, CDR могут быть любыми из Kabat, Chothia, комбинированными CDR, или их комбинациями.

В некоторых вариантах реализации, изобретение предусматривает полипептид (который могут быть или не быть антителом), который содержит по меньшей мере один CDR, по меньшей мере два, по меньшей мере три, или по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, или все шесть CDR, которые по существу идентичны по меньшей мере одному CDR, по меньшей мере двум, по меньшей мере трем, по меньшей мере четырем, по меньшей мере пяти или всем шести CDR G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6. Другие варианты реализации включают антитела, имеющие по меньшей мере два, три, четыре, пять или шесть CDR(s), которые по существу идентичны по меньшей мере двум, трем, четырем, пяти или шести CDR G1, или получены из G1. В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или шесть CDR(s) являются на по меньшей мере около 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, или 99 % идентичными по отношению к по меньшей мере одному, двум, трем, четырем, пяти или шести CDR G1 или его вариантам, представленных в Таблице 6. Следует понимать, что, в целях настоящего изобретения, специфичность связывания и/или общая активность обычно сохраняется, хотя степень проявления активности может меняться по сравнению с G1 или его вариантами, представленными в Таблице 6 (может быть больше или меньше).

В некоторых вариантах реализации, изобретение также предусматривает полипептид (который могут быть или не быть антителом), содержащий аминокислотную последовательность G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6, которая содержит любой из следующих вариантов: по меньшей мере 5 последовательно расположенных аминокислот, по меньшей мере 8 последовательно расположенных аминокислот, по меньшей мере около 10 последовательно расположенных аминокислот, по меньшей мере около 15 последовательно расположенных аминокислот, по меньшей мере около 20 последовательно расположенных аминокислот, по меньшей мере около 25 последовательно расположенных аминокислот, по меньшей мере около 30 последовательно расположенных аминокислот из последовательности G1 или его вариантов,

представленных в Таблице 6, где по меньшей мере 3 из аминокислот проинадлежат к вариабельной области G1 (Фигура 5) или ее вариантов, представленных в Таблице 6. В одном варианте реализации, вариабельная область принадлежит к легкой цепи G1. В другом варианте реализации, вариабельная область принадлежит к тяжелой цепи G1.

5 Типичный полипептид содержит последовательно расположенные аминокислоты (длины указаны выше) из вариабельных участков как тяжелой, так и легкой цепей G1. В другом варианте реализации, 5 (или больше) последовательно расположенных аминокислот принадлежат к участку, определяющему комплементарность (CDR) G1, представленного на Фигуре 5. В некоторых вариантах реализации, последовательно  
10 расположенные аминокислоты принадлежат к вариабельной области G1.

Аффинность связывания ( $K_D$ ) антагонистического антитела против CGRP и полипептида с CGRP (таким как человеческий  $\alpha$ -CGRP) может составлять от около 0,06 до около 200 нМ. В некоторых вариантах реализации, аффинность связывания имеет любое значение из около 200 нМ, 100 нМ, около 50 нМ, около 10 нМ, около 1  
15 нМ, около 500 пМ, около 100 пМ, около 60 пМ, около 50 пМ, около 20 пМ, около 15 пМ, около 10 пМ, около 5 пМ, или около 2 пМ. В некоторых вариантах реализации, аффинность связывания имеет значение меньше любой величины из около 250 нМ, около 200 нМ, около 100 нМ, около 50 нМ, около 10 нМ, около 1 нМ, около 500 пМ, около 100 пМ, или около 50 пМ.

20 В некоторых вариантах реализации, изобретение также предусматривает способы получения любого из таких антител или полипептидов. Антитела по настоящему изобретению могут быть получены с использованием процедур, известных специалистам. Полипептиды могут быть получены путем протеолитической или другой деградации антител, рекомбинантными способами (например, одноцепочечные  
25 (single) или гибридные полипептиды), как описано выше, или путем химического синтеза. Полипептиды антител, особенно короткое полипептиды длиной до около 50 аминокислот, удобно получать путем химического синтеза. Способы химического синтеза известны специалистам и являются коммерчески доступными. Например, антитело может быть получено с помощью автоматизированного полипептидного  
30 синтезатора, использующего твердофазный метод. См. также патентах США № 5807715; 4816567; и 6331415.

В другой альтернативе, антитела могут быть получены рекомбинантно с использованием процедур, хорошо известных специалистам. В одном варианте

реализации, полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую переменные участки тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела G1, представленного в SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10. В другом варианте реализации, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10, 5 клонируют в один или несколько векторов для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующая антитело, представляющее интерес, может поддерживаться в векторе в клетке-хозяине, и клетка-хозяин может быть затем растянута и заморожена для последующего использования. Вектора (включая экспрессионные вектора) и клетки-хозяева дополнительно описаны в данном 10 документе.

В некоторых вариантах реализации, изобретение также охватывает одноцепочечные фрагменты переменной области ("scFv") антител по настоящему изобретению, таких как G1. Одноцепочечные фрагменты переменной области получают путем связывания переменных областей легкой и/или тяжелой цепей с 15 использованием короткого связывающего пептида. Bird et al. (1988) Science 242:423-426. Примером связывающего пептида является (GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 57), который образует мостик длиной приблизительно 3,5 нм между карбоксильным концом одной переменной области и аминоконцом другой переменной области. Были сконструированы и использовались линкеры с другими последовательностями. Bird et 20 al. (1988). Линкеры могут быть в свою очередь модифицированы для обеспечения дополнительных функций, таких как присоединение лекарственных средств или присоединение к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты могут быть получены рекомбинантно или путем синтеза. Для получения scFv путем синтеза может быть использован автоматизированный синтезатор. Для рекомбинантного 25 продуцирования scFv, пригодная плазмида, содержащая полинуклеотид, кодирующий scFv, может быть введена в пригодную клетку-хозяина, которая может быть эукариотической, такой как клетки дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих, или прокариотической, такой как *E. coli*. Полинуклеотиды, кодирующие scFv, представляющий интерес, могут быть получены с помощью 30 рутинных манипуляций, таких как лигирование полинуклеотидов. Полученный scFv может быть выделен с использованием стандартных методик очистки белков, известных специалистам.

Другие формы одноцепочечных антител, таких как диатела, также охвачены (данным документом). Диатела представляют собой бивалентные, биспецифические антитела, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, слишком короткого для того, чтобы обеспечить  
5 возможность конъюгации двух доменов, расположенных в одной цепи, тем самым принуждая домены к конъюгации с комплементарными доменами другой цепи и создавая два антигенсвязывающих сайта (см. например, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Например, биспецифические антитела, моноклональные антитела, обладающие  
10 специфичностями связывания по отношению к по меньшей мере двум разным антигенам, могут быть получены с использованием антитела, раскрытого в данном документе. Способы получения биспецифических антител известны специалистам (см., например, Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121:210). Традиционно, рекомбинантное продуцирование биспецифических антител было основано на  
15 коэкспрессии двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина, причем две тяжелые цепи имеют разные специфичности (Millstein and Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

В соответствии с одним подходом к получению биспецифических антител, переменные домены антитела с желательными специфичностями связывания  
20 (паратопы антитело-антиген) сливаются с последовательностями константного домена иммуноглобулина. Слияние предпочтительно проводят с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирного, CH2 и CH3 участков. Предпочтительно, чтобы константная область первой тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи,  
25 присутствовала в по меньшей мере одном из (продуктов) слияния. ДНК, кодирующие (продукты) слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, при необходимости, легкой цепи иммуноглобулина, вставляют в разные экспрессионные вектора и совместно трансфицируют в пригодный организм-хозяин. Это обеспечивает большую гибкость в  
30 регулировании взаимного соотношения трех полипептидных фрагментов в вариантах реализации, когда неравные соотношения трех полипептидных цепей, используемых при конструировании, обеспечивают оптимальный выход. Однако, можно вставлять кодирующие последовательности двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессионный вектор, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей

в равных соотношениях приводит к высокому выходу, или если величины соотношений не имеют особого значения.

В одном подходе, биспецифические антитела состоят из тяжелой цепи гибридного иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одной ветви, и пары тяжелая цепь-легкая цепь гибридного иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания) в другой ветви. Такая асимметричная структура, с легкой цепью иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы, облегчает разделение желательного биспецифического соединения и нежелательных комбинаций иммуноглобулиновых цепей. Этот подход описан в публикации РСТ № WO 94/04690, опубликованной 3 марта 1994 г.

Гетероконъюгированные антитела, содержащие два ковалентно связанные антитела, также входят в объем изобретения. Такие антитела использовались для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (патент США № 4676980), и для лечения инфекции ВИЧ (публикации заявок РСТ №№ WO 91/00360 и WO 92/200373; EP 03089). Гетероконъюгированные антитела могут быть получены с использованием любых удобных способов сшивания. Пригодные сшивающие агенты и методики хорошо известны специалистам, и описаны в патенте США № 4676980.

Химерные или гибридные антитела также могут быть получены *in vitro* с использованием известных способов химического синтеза белков, включая способы, предусматривающие использование сшивающих агентов. Например, иммунотоксины могут быть сконструированы с использованием реакции дисульфидного обмена или путем образования тиоэфирной связи. Примеры реагентов, пригодных для этой цели, включают имиотиолят и метил-4-меркаптобутиримидат.

Гуманизированное антитело, содержащее один или несколько CDR антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6, или один или несколько CDR, выделенных из антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6, могут быть получены с использованием любых способов, известных специалистам. Например, для гуманизации моноклонального антитела могут быть использованы четыре общих стадии.

В некоторых вариантах реализации, изобретение охватывает модификации антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6, включая функционально эквивалентные антитела, которые существенно не отличаются по своим свойствам, и варианты, имеющие повышенную или сниженную активность и/или аффинность.

Например, аминокислотная последовательность антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6, может быть мутирована для получения антитела с желательной аффинностью связывания с CGRP. Модификация полипептидов является рутинной практикой в данной области техники и не требуют детального описания в данном документе. Типичные примеры модификации полипептидов приведены в Примерах. Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды с консервативными замещениями аминокислотных остатков, одну или несколько делеций или аддаций аминокислот, которые не ухудшают значительно функциональную активность, или использование химических аналогов.

Инсерции аминокислотных последовательностей включают амино- и/или карбоксиконцевые слияния, имеющие длину в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или больше остатков, а также инсерции одноро или множества аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры терминальных инсерций включают антитело с N-концевым метионильным остатком или антитело, слитое с эпитопом-меткой. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают присоединение к N- или C-концу антитела фермента или полипептида, который увеличивает период полувыведения антитела из сыворотки.

Варианты замещения имеют удаление по меньшей мере одного аминокислотного остатка в молекуле антитела и вставку другого остатка на его место. Сайты, представляющие наибольший интерес для заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные области, но предусматриваются также изменения каркасных областей (FR). Консервативные замещения представлены в Таблице 1 под заголовком "консервативные замещения". Если такие замещения приводят к изменению биологической активности, то могут быть введены более значительные изменения, обозначенные как "типичные замещения" в Таблице 1, или как дополнительно описано ниже со ссылкой на классы аминокислот, и продукты могут быть подвергнуты скринингу.

Таблица 1: Аминокислотные замещения

Исходный остаток	Консервативные замещения	Типичные замещения
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg

Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин
Leu (L)	Ile	норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин

Существенные модификации биологических свойств антитела осуществляются путем выбора замещений, которые значительно отличаются по своему эффекту на сохранение (а) структуры полипептидного скелета в области замещения, например, такой как конформация листа или спирали, (b) заряд или гидрофобность молекулы в целевом сайте, или (c) объем боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки разделены на группы на основании общих свойств боковых цепей:

- (1) Неполярные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Полярные без заряда: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Кислотные (отрицательно заряженные): Asp, Glu;
- (4) Основные (положительно заряженные): Lys, Arg;
- (5) Остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro; and
- (6) Ароматические: Trp, Tyr, Phe, His.

Неконсервативные замещения проводят путем замены члена одного из этих классов на другой класс.

Любой цистеиновый остаток, не принимающий участия в сохранении надлежащей конформации антитела, также может быть замещен, обычно на серин, для улучшения устойчивости молекулы к окислению и предотвращения аберрантного сшивания. Наоборот, цистеиновая связь (связи) может быть добавлена в антитело для улучшения его стабильности, особенно в тех случаях, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fv.

Аминокислотные модификации могут изменяться от замены или модификации одной или нескольких аминокислот до полной перестройки области, такой как переменная область. Изменения в переменной области могут изменять аффинность связывания и/или специфичность. В некоторых вариантах реализации, в CDR-домене выполняется не более чем от одного до пяти консервативных аминокислотных замещений. В других вариантах реализации, в CDR-домене выполняется не более чем от одного до трех консервативных аминокислотных замещений. В других вариантах реализации, CDR-домен представляет собой CDR H3 и/или CDR L3.

Модификации также включают гликозилированные и негликозилированные полипептиды, а также полипептиды с другими посттрансляционными модификациями, такими как, например, гликозилирование разными сахарами, ацетилирование и фосфорилирование. Антитела гликозилируют в консервативных положениях в мз константных областях (Jefferis and Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright and Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). Олигосахаридные боковые цепи иммуноглобулинов влияют на функцию белка (Boyd et al., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180) и внутримолекулярные взаимодействия между частями гликопротеина, что может отражаться на конформации и презентуемой трехмерной поверхности гликопротеина (Jefferis and Lund, supra; Wyss and Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416). Олигосахариды могут также служить для нацеливания данного гликопротеина на определенные молекулы на основании специфических структур распознавания. Также сообщалось, что гликозилирование антител влияет на опосредованную антителами клеточную цитотоксичность (ADCC). В частности, сообщалось, что клетки CHO с тетрациклин-регулируемой экспрессией  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII), представляющей собой гликозилтрансферазу, катализирующую образование GlcNAc в точках ветвления, обладают повышенной ADCC-активностью (Umana et al., 1999, Mature Biotech. 17:176-180).

Гликозилирование антител типично является N-связанным или O-связанным. N-связанный относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин, аспарагин-X-треонин и аспарагин-X-цистеин, где X обозначает любую аминокислоту за исключением пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к аспарагиновой боковой цепи. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к оксиаминокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя могут быть использованы также 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление сайтов гликозилирования в антитело удобно осуществляется путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько из вышеописанных трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Альтернатива также может быть получена путем аддиции, или замещения, одного или нескольких сериновых или треониновых остатков в последовательность исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования).

Характер гликозилирования антител также может быть изменен без изменения базовой нуклеотидной последовательности. Гликозилирование в значительной степени зависит от клетки-хозяина, используемой для экспрессии антитела. Поскольку типы клеток, используемых для экспрессии рекомбинантных гликопротеинов, например, антител, в качестве потенциальных терапевтических средств, редко являются нативными клетками, можно ожидать вариаций в характере гликозилирования антител (см., например Hse et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070).

В дополнение к выбору клеток-хозяев, факторы, влияющие на гликозилирование при рекомбинантном продуцировании антител, включают способ выращивания, рецептуру среды, плотность культуры, оксигенацию, рН, схемы очистки и т.п. Были предложены различные способы для изменения характера гликозилирования, обеспечиваемого в конкретном организме-хозяине, включая введение или сверхэкспрессию определенных ферментов, участвующих в продуцировании олигосахарида (патенты США № 5047335; 5510261 и 5278299).

Гликозилирование, или определенные типы гликозилирования, могут быть ферментативно удалены из гликопротеина, например, с использованием эндогликозидазы H (Endo H), N-гликозидазы F, эндогликозидазы F1, эндогликозидазы F2, эндогликозидазы F3. Дополнительно, рекомбинантная клетка-хозяин может быть генетически модифицирована для превращения в дефектную по переработке определенных типов полисахаридов. Эти и схожие методики хорошо известны специалистам.

Другие способы модификации включают использование методик связывания, известных специалистам, включая, без ограничений, ферментативные способы, окислительное замещение и хелатообразование. Модификации могут быть использованы, например, для присоединения меток для иммунологического анализа. Модифицированные полипептиды G1 могут быть получены с использованием отработанных процедур в данной области техники и могут быть подвергнуты скринингу с использованием стандартных методов анализа, известных специалистам, некоторые из которых описаны ниже и в Примерах.

В некоторых вариантах реализации изобретения, антитело содержит модифицированную константную область, такую как константная область, которая является иммунологически инертной или частично инертной, например, не инициирует медируемый компонентом лизис, не стимулирует опосредованную антителами клеточную цитотоксичность (ADCC), или не активирует микроглию; или имеет сниженные (по сравнению с немодифицированным антителом) любую одну или несколько из следующих активностей: инициирование медируемого компонентом лизиса, стимулирование опосредованной антителами клеточной цитотоксичности (ADCC), или активирование микроглии. Разные модификации константной области могут быть использованы для достижения оптимального уровня и/или комбинации эффекторных функций. См., например, Morgan et al., *Immunology* 86:319-324 (1995); Lund et al., *J. Immunology* 157:4963-9 157:4963-4969 (1996); Idusogie et al., *J. Immunology* 164:4178-4184 (2000); Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601 (1989); и Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76 (1998). В некоторых вариантах реализации, константная область является модифицированной, как описано в Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; заявке РСТ № РСТ/GB99/01441; и/или патентной заявке Великобритании № 9809951.8. В других вариантах реализации, антитело содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG2, содержащую следующие

мутации: A330P331 на S330S331 (нумерация аминокислот в соответствии с последовательностью IgG2 дикого типа). *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624. В других вариантах реализации, константная область агликозилирована для N-связанного гликозилирования. В некоторых вариантах реализации, константная область агликозилирована для N-связанного гликозилирования путем мутации гликозилированного аминокислотного остатка или фланкирующих остатков, являющихся частью последовательности распознавания N-гликозилирования в константной области. Например, N297 сайта N-гликозилирования может быть мутирован на A, Q, K, или H. См., Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601 (1989); и Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76 (1998). В некоторых вариантах реализации, константная область агликозилирована для N-связанного гликозилирования. Константная область может быть агликозилирована для N-связанного гликозилирования ферментативно (например, путем удаления углевода ферментом PNGase (пептид-N-гликозидаза)), или путем экспрессии в дефицитной по гликозилированию клетке-хозяине.

Другие модификации антитела включают антитела, модифицированные как описано в публикации РСТ № WO 99/58572, опубликована 18 ноября 1999 г. These антитела содержат, в дополнение к связывающему домену, нацеленному на молекулу-мишень, эффекторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, по существу гомологичную всему или части константного домена тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина. Такие антитела способны связываться с молекулой-мишенью без инициирования значительного комплементзависимого дизиса, или клеточно-медируемой деструкции мишени. В некоторых вариантах реализации, эффекторный домен способен специфически связывать FcRn и/или FcγRIIb. Они типично основаны на химерных доменах, выделенных из двух или больше C<sub>H</sub>2 доменах тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина. Антитела, модифицированные таким образом, являются особенно пригодными для использования в хронической терапии антителами, во избежание воспалительных и другие нежелательных реакций на обычную терапию антителами.

В некоторых вариантах реализации, изобретение включает варианты реализации со зрелой аффинностью. Например, антитела со зрелой аффинностью могут быть получены с помощью процедур, известных специалистам (Marks et al., 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783; Barbas et al., 1994, *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-

3813; Schier et al., 1995, Gene, 169:147-155; Yelton et al., 1995, J. Immunol., 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol., 154(7):3310-9; Hawkins et al, 1992, J. Mol. Biol., 226:889-896; и WO2004/058184).

Следующие способы могут быть использованы для регуляции аффинности антитела и для характеристики CDR. Один из способов характеристики CDR антитела и/или изменения (такого как улучшение) аффинности связывания полипептида, такого как антитело, называется "мутагенез со сканированием библиотеки". В общем, мутагенез со сканированием библиотеки работает следующим образом. Одно или несколько аминокислотных положений в CDR замещают двумя или больше (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20) аминокислотами с использованием известных специалистам способов. В результате этого получают маленькие библиотеки клонов (в некоторых вариантах реализации, по одной для каждого анализируемого аминокислотного положения), каждая со сложностью в два или больше членов (если две или больше аминокислот используют для замещения каждого положения). Обычно, библиотека также включает клон, содержащий нативную (незамещенную) аминокислоту. Небольшое количество клонов, например, около 20-80 клонов (в зависимости от сложности библиотеки), из каждой библиотеки подвергают скринингу на аффинность связывания с полипептидом-мишенью (или другой мишенью связывания), и идентифицируют кандидаты с повышенным, таким же, пониженным, или без связывания. Способы определения аффинности связывания хорошо известны специалистам. Аффинность связывания может быть определена с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса методом Biacore, который детектирует различия в аффинности связывания около в 2 раза или больше. Biacore особенно полезен в тех случаях, когда исходное антитело уже связывается с относительно высокой аффинностью, например, имеет  $K_D$ , равную около 10 нМ или меньше. Скрининг с использованием поверхностного плазмонного резонанса Biacore описан в данном документе в Примерах.

Аффинность связывания может быть определена с использованием Kinexa Biosensor, сцинтилляционных анализов сближения, ИФА, иммунологического анализа ORIGEN (IGEN), гашения флуоресценции, переноса флуоресценции, и/или дрожжевого дисплея. Аффинность связывания также может быть подвергнута скринингу с использованием пригодного биоанализа.

В некоторых вариантах реализации, каждое аминокислотное положение в CDR замещают (в некоторых вариантах реализации, по одному за раз) всеми 20 природными аминокислотами с использованием известных специалистам способов мутагенеза (некоторые из которых описаны в данном документе). В результате этого получают  
5 маленькие библиотеки клонов (в некоторых вариантах реализации, по одной на каждое анализируемое аминокислотное положение), каждая со сложностью в 20 членов (если каждое положение замещается всеми 20 аминокислотами).

В некоторых вариантах реализации, библиотека для использования при скрининге содержит замещения в двух или больше положениях, которые могут  
10 находиться в одном CDR или в двух или больше CDR. Таким образом, библиотека может содержать замещения в двух или больше положениях в одном CDR. Библиотека может содержать замещения в двух или больше положениях в двух или больше CDR. Библиотека может содержать замещение в 3, 4, 5 или больше положениях, причем указанных положения находятся в двух, трех, четырех, пяти или шести CDR.  
15 Замещение может быть получен с использованием кодонов с низкой избыточностью. См., например, Таблицу 2 в Balint et al., (1993) Gene 137(1):109-18).

CDR может представлять собой CDRH3 и/или CDRL3. CDR может быть одним или несколькими из CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, и/или CDRH3. CDR может представлять собой CDR по системе Kabat, CDR по системе Chothia или  
20 расширенный CDR.

Кандидаты с улучшенным связыванием могут быть секвенированы, с идентификацией при этом мутанта с замещением CDR, которое приводит к повышенной аффинности (также называемым "улучшенным" замещением). Кандидаты, способные связываться, также могут быть секвенированы, с  
25 идентификацией при этом замещений CDR, при которых сохраняется связывание.

Может быть проведено множество раундов скрининга. Например, кандидаты (каждый содержит аминокислотное замещение в одном или нескольких положениях одного или нескольких CDR) с улучшенным связыванием также пригодны для конструирования второй библиотеки, содержащей по меньшей мере исходную и  
30 замещенную аминокислоту в каждом улучшенном положении CDR (т.е., аминокислотном положении в CDR, в котором мутант с замещением продемонстрировал улучшенное связывание). Приготовление и скрининг или селекция такой библиотеки дополнительно описаны ниже.

Мутагенез со сканированием библиотеки также предусматривает средства для характеристики CDR, в той степени, в которой частота клонов с улучшенным связыванием, таким же связыванием, пониженным связыванием или отсутствием связывания также содержит информацию о важности каждого аминокислотного положения для стабильности комплекса антитело-антиген. Например, если некоторое положение CDR сохраняет связывание при замене на все 20 аминокислот, то это положение идентифицируется как положение, которое с низкой вероятностью требуется для связывания антигена. Наоборот, если некоторое положение CDR сохраняет связывание только при небольшой доле замещений, то это положение идентифицируется как положение, важное для функции CDR. Таким образом, способы мутагенеза со сканированием библиотеки дают информацию, касающуюся положений в CDR, которые могут быть заменены на различные аминокислоты (включая все 20 аминокислот), и положений в CDR, которые не могут быть изменены или которые могут быть заменены только на несколько аминокислот.

Кандидаты с улучшенной аффинностью могут быть объединены во вторую библиотеку, которая включает улучшенную аминокислоту, исходную аминокислоту в данном положении, и может дополнительно включать дополнительные замещения в данном положении, в зависимости от сложности библиотеки, являющейся желательной или допустимой при использовании желательного способа скрининга или селекции. Дополнительно, при необходимости, прилегающие аминокислотные положения могут быть рандомизированы по меньшей мере двумя или больше аминокислотами. Рандомизация прилегающих аминокислоты может обеспечить дополнительную конформационную гибкость мутантной CDR, которая может, в свою очередь, обеспечить возможность или способствовать введению большего количества улучшающих мутаций. Библиотека может также содержать замещения в положениях, которые не демонстрируют улучшенной аффинности при первом раунде скрининга.

Вторая библиотека подвергается скринингу или селекции членов библиотеки с улучшенной и/или измененной аффинностью связывания с использованием любого способа, известного специалистам, включая скрининг с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса методом Biacore, и селекцию с использованием любого способа селекции, известного специалистам, включая фаговый дисплей, дрожжевой дисплей и рибосомальный дисплей.

В некоторых вариантах реализации, изобретение также охватывает гибридные белки, содержащие один или несколько фрагментов или областей антител (таких как G1) или полипептидов по данному изобретению. В одном варианте реализации, предусматривается гибридный полипептид, который содержит по меньшей мере 10 последовательно расположенных аминокислот вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:2 (Фигура 5) и/или по меньшей мере 10 аминокислот вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO:1 (Фигура 5). В других вариантах реализации, предусматривается гибридный полипептид, который содержит по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 25, или по меньшей мере около 30 последовательно расположенных аминокислот вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:2 (Фигура 5), и/или по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 25, или по меньшей мере около 30 последовательно расположенных аминокислот вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO:1 (Фигура 5). В другом варианте реализации, гибридный полипептид содержит вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи G1, как показано в SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:1 Фигуры 5. В другом варианте реализации, гибридный полипептид содержит один или несколько CDR(s) G1. В других вариантах реализации, гибридный полипептид содержит CDR H3 и/или CDR L3 антитела G1. В целях настоящего изобретения, гибридный белок G1 содержит одно или несколько антител G1 и другую аминокислотную последовательность, с которой оно не связано в нативной молекуле, например, гетерологичную последовательность или гомологичную последовательность из другой области. Типичные примеры гетерологичных последовательностей включают, без ограничений, "метку", такую как метка FLAG или метка 6His (SEQ ID NO: 56). Метки хорошо известны специалистам.

Гибридный полипептид G1 может быть создан способами, известными специалистам, например, путем синтеза или рекомбинантно. Типично, гибридные белки G1 по настоящему изобретению получают путем приготовления и (an) экспрессии кодирующего их полинуклеотида, с использованием рекомбинантных способов, описанных в данном документе, хотя они также могут быть получены другими способами, известными специалистам, включая, например, химический синтез.

В некоторых аспектах, данное изобретение также предусматривает композиции, содержащие антитела или полипептиды, полученные из G1, конъюгированного (например, связанного) с агентом, который способствует связыванию с твердой подложкой (таким как биотин или авидин). Для простоты, обычно будет проводиться ссылка на G1 или антитела, подразумевающая, что данные способы применимы к любым вариантам реализации связывания CGRP, описанным в данном документе. Конъюгация обычно относится к связыванию таких компонентов, как описано в данном документе. Связывание (которое обычно закрепляет такие компоненты в тесной связи по меньшей мере для введения) может быть осуществлено любым из ряда способов. Например, возможна прямая реакция между агентом и антителом, когда каждый из них имеет заместитель, способный реагировать с другим. Например, нуклеофильная группа, такая как amino или сульфгидрильная группа, на одном (из них) может быть способна реагировать с карбонилсодержащей группой, такой как ангидрид или галогеноангидрид, или с алкильной группой, содержащей пригодную отходящую группу (например, галогенид) на другом.

Антитело или полипептид может быть связаны с агентом-меткой (альтернативно называемым “метка”), таким как флуоресцентная молекула, радиоактивная молекула или любые другие метки, известные специалистам. Специалистам известны метки, которые обычно обеспечивают (прямо или опосредованно) сигнал.

В некоторых вариантах реализации, изобретение также предусматривает композиции (включая фармацевтические композиции) и наборы, содержащие антитело G1, и/или любое из или все антитела или полипептиды, описанные в данном документе.

В некоторых вариантах реализации, изобретение также предусматривает выделенные полинуклеотиды, кодирующие антитела и полипептиды по изобретению (включая антитело, содержащее полипептидные последовательности переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи, представленные на Фигуре 5), и вектора и клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид.

В некоторых вариантах реализации, изобретение предусматривает полинуклеотиды (или композиции, включая фармацевтические композиции), содержащие полинуклеотиды, кодирующие любые материалы из следующих: (a) антитело G1 или его варианты, представленные в Таблице 6; (b) фрагмент или область

антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; (c) легкую цепь антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; (d) тяжелую цепь антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; (e) одну или несколько переменных областей легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; (f) один или несколько CDR (один, два, три, четыре, пять или шесть CDR) антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; (g) CDR H3 тяжелой цепи антитела G1; (h) CDR L3 легкой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; (i) три CDR легкой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; (j) три CDR тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; (k) три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи, антитела G1 или его вариантов, представленных в Таблице 6; и (l) антитело, содержащее любой вариант из описанных в пунктах (b) - (k). В некоторых вариантах реализации, полинуклеотид содержит любой из или оба полинуклеотида, представленные в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

15 В другом аспекте, изобретение предусматривает полинуклеотиды, кодирующие любые антитела (включая фрагменты антител) и полипептиды, описанные в данном документе, такие как антитела и полипептиды, имеющие нарушенную эффекторную функцию. Полинуклеотиды могут быть получены с помощью процедур, известных специалистам.

20 В другом аспекте, изобретение предусматривает композиции (такие как фармацевтические композиции) содержащие любые полинуклеотиды по изобретению. В некоторых вариантах реализации, композиция содержит экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий антитело G1, как описано в данном документе. В другом варианте реализации, композиция содержит экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий любые антитела или полипептиды, описанные в данном документе. В других вариантах реализации, композиция содержит любой из или оба полинуклеотида, представленные SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10. Экспрессионные вектора и введение полинуклеотидных композиций дополнительно описаны в данном документе.

30 В другом аспекте, изобретение предусматривает способ получения любых полинуклеотидов, описанных в данном документе.

Полинуклеотиды, комплементарные любым таким последовательностям, также входят в объем настоящего изобретения. Полинуклеотиды могут быть

одноцепочечными (кодирующими или антисмысловыми) или двухцепочечными, и могут представлять собой молекулы ДНК (геномные, кДНК или синтетические) или РНК. Молекулы РНК включают молекулы гетерогенной ядерной РНК (гЯРНК), которые содержат интроны и однозначно соответствуют молекуле ДНК, и молекулы мРНК, которые не содержат интроны. Дополнительные кодирующие или некодирующие последовательности могут, но не обязательно, присутствовать в полинуклеотиде по настоящему изобретению, и полинуклеотид может, но не обязательно, быть связан с другими молекулами и/или материалами подложки.

Полинуклеотиды могут содержать нативную последовательность (т.е., эндогенную последовательность, которая кодирует антитело или его часть) или могут содержать вариант такой последовательности. Варианты полинуклеотидов содержат одно или несколько замещений, аддиций, делеций и/или инсерций таким образом, чтобы иммунореактивность кодируемого полипептида не снижалась по сравнению с нативной иммунореактивной молекулой. Эффект кодируемого полипептида на иммунореактивность можно обычно оценить, как описано в данном документе. Варианты предпочтительно проявляют по меньшей мере около 70 % идентичности, более предпочтительно, по меньшей мере около 80 % идентичности, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере около 90 % идентичности с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей нативное антитело или его часть.

Говорят, что две полинуклеотидные или полипептидные последовательности являются "идентичными", если порядок расположения нуклеотидов или аминокислот в двух последовательностях одинаков при выравнивании с максимальным соответствием, как описано ниже. Сравнения двух последовательностей типично проводят путем сравнения последовательностей в окне сравнения с целью идентификации и сравнения подобия локальных участков последовательностей. "Окно сравнения", в используемом в данном документе значении, относится к сегменту, состоящему из по меньшей мере около 20 последовательно расположенных позиций, обычно от 30 до около 75, от 40 до около 50, в котором последовательность может сравниваться с референсной последовательностью, состоящей из такого же числа последовательно расположенных позиций после выравнивания двух последовательностей.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено с использованием программы Megalign in пакета прикладных

биоинформационных программ Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), с использованием параметров по умолчанию. Эта программа реализует несколько схем выравнивания, описанных в следующих литературных источниках: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. в книге: 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.

Предпочтительно, "процент идентичности последовательностей" определяется путем сравнения двух выровненных последовательностей в окне сравнения, состоящем из по меньшей мере 20 позиций, причем часть последовательности полинуклеотида или полипептида в окне сравнения может содержать аддиции или делеции (т.е. пробелы), составляющие 20 процентов или меньше, обычно от 5 до 15 процентов, или от 10 до 12 процентов, по сравнению с референсными последовательностями (не содержащими аддиции или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывается путем определения числа позиций, в которых в обоих последовательностях находятся идентичные основания нуклеиновых кислот или аминокислотные остатки, с получением числа совпадающих позиций, деления числа совпадающих позиций на общее число позиций в референсной последовательности (т.е. размер окна), и умножения результатов на 100, с получением процента идентичности последовательностей.

Варианты могут также, или альтернативно, быть по существу гомологичными по отношению к нативному гену, или его части или комплементу. Такие полинуклеотидные варианты способны гибридизироваться в умеренно жестких условиях с природной последовательностью ДНК, кодирующей нативное антитело (или комплементарной последовательностью).

Пригодные "умеренно жесткие условия" включают предварительную промывку раствором 5xSSC, 0,5 % SDS, 1,0 mM ЭДТА (pH 8,0); гибридизацию при 50-65 °C,

5xSSC, в течение ночи; с последующей промывкой дважды при 65 °C в течение 20 минут каждым из 2x, 0,5x и 0,2xSSC, содержащим 0,1 % SDS.

В используемом в данном документе значении, "высокожесткими условиями" или "условиями высокой жесткости" являются такие, в которых: (1) используются низкая ионная сила и высокая температура для промывки, например, 0,015 М хлорида натрия/0,0015 М цитрата натрия/0,1 % додецилсульфата натрия при 50 °C; (2) используется денатурирующий агент во время гибридизации, такой как формамид, например, 50 % (об./об.) формамида с 0,1 % бычьего сывороточного альбумина/0,1 % фиколла/0,1 % поливинилпирролидона/50 мМ натрийфосфатного буфера с pH 6,5, с 750 мМ хлорида натрия, 75 мМ цитрата натрия при 42 °C; или (3) используются 50 % формамид, 5xSSC (0,75 М NaCl, 0,075 М цитрата натрия), 50 мМ фосфата натрия (pH 6,8), 0,1 % пиродифосфата натрия, 5x раствор Денхардта, озвученная ДНК спермы лосося (50 мкг/мл), 0,1 % SDS (додецилсульфат натрия), и 10 % сульфата декстрана при 42 °C, с промывками при 42 °C в 0,2xSSC (хлорид натрия/цитрат натрия) и 50 % формамиде при 55 °C, с последующей промывкой в условиях высокой жесткости, состоящей из 0,1xSSC, содержащего ЭДТА, при 55 °C. Квалифицированному специалисту будет понятно, каким образом отрегулировать температуру, ионную силу и т.д. требуемым образом для учета таких факторов, как длина зонда и т.п.

Рядовым специалистам в данной области техники будет понятно, что в результате вырожденности генетического кода, существует большое количество нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептид, описанный в данном документе. Некоторые из таких полинуклеотидов несут минимальную гомологию с нуклеотидной последовательностью любого нативного гена. Тем не менее, полинуклеотиды, различающиеся вследствие отличий в использовании кодонов, конкретно предусмотрены настоящим изобретением. Дополнительно, аллели генов, содержащих полинуклеотидные последовательности, предусматриваемые в данном документе, входят в объем настоящего изобретения. Аллели представляют собой эндогенные гены, измененные в результате одной или нескольких мутаций, такие как делеции, аддиции и/или замещения нуклеотидов. Образующиеся при этом мРНК и белок могут, но не обязательно будут, иметь измененную структуру или функцию. Аллели могут быть идентифицированы с использованием стандартных методик (таких как гибридизация, амплификация и/или сравнение с базой данных последовательностей).

Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть получены с использованием химического синтеза, рекомбинантных способов, или ПЦР. Способы химического синтеза полинуклеотидов хорошо известны специалистам и не требуют  
5  
области техники может использовать последовательности, предусматриваемые в  
данном документе, и коммерческий синтезатор ДНК для продуцирования желательной  
ДНК-последовательности.

Для получения полинуклеотидов с использованием рекомбинантных способов, полинуклеотид, содержащий желательную последовательность, может быть вставлен в  
10  
пригодный вектор, и вектор в свою очередь может быть введен в пригодную клетку-  
хозяина для репликации и амплификации, как дополнительно описано в данном  
документе. Полинуклеотиды могут быть введены в клетки-хозяева любыми способами,  
известными специалистам. Клетки трансформируют введением экзогенного  
полинуклеотида путем прямого поглощения, эндоцитоза, трансфекции, F-спаривания  
15  
или электропорации. После введения, экзогенный полинуклеотид может  
поддерживаться в клетке как неинтегрированный вектор (такой как плазида) или  
быть интегрирован в геном клетки-хозяина. Амплифицируемый таким образом  
полинуклеотид может быть выделен из клетки-хозяина способами, хорошо известными  
в данной области техники. См., например, Sambrook et al. (1989).

Альтернативно, ПЦР позволяет репродуцировать ДНК-последовательности. Технология ПЦР хорошо известна специалистам и описана в патентах США №№  
20  
4683195, 4800159, 4754065 и 4683202, а также в PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauser Press, Boston (1994).

РНК может быть получена путем использования выделенной ДНК в  
25  
соответствующем векторе и введения его в пригодную клетку-хозяина. Когда клетка  
реплицируется и ДНК транскрибируется в РНК, эта РНК может быть затем выделена с  
использованием способов, хорошо известных квалифицированным специалистам в  
данной области техники, как описано, например, в Sambrook et al., (1989).

Пригодные клонирующие вектора могут быть сконструированы в соответствии  
30  
со стандартными методиками, или могут быть выбраны из большого числа  
клонированных векторов, доступных в данной области техники. Хотя выбранный  
клонированный вектор может меняться в зависимости от клетки-хозяина,  
предназначенной для использования, пригодные клонирующие вектора обычно будут

обладать способностью к саморепликации, могут иметь один (сайт-)мишень для конкретной эндонуклеазы рестрикции, и/или может нести гены маркера, который может быть использован при селекции клонов, содержащих вектор. Пригодные примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например, pUC18, pUC19, 5 Bluescript (например, pBS SK+) и его производные, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, фаговые ДНК, и челночные вектора, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие клонирующие вектора доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Strategene и Invitrogen.

Экспрессионные вектора обычно представляют собой реплицируемые 10 полинуклеотидные конструкции, содержащие полинуклеотид в соответствии с любым из различных аспектов изобретения. Подразумевается, что экспрессионный вектор должен быть пригодным для репликации в клетках-хозяевах или в качестве эписом или как составная часть хромосомной ДНК. Пригодные экспрессионные вектора включают, без ограничений, плазмиды, вирусные вектора, включая аденовирусы, 15 адено-ассоциированные вирусы, ретровирусы, космиды, и экспрессионный вектор (вектора), раскрытые в публикации РСТ № WO 87/04462. Компоненты вектора могут обычно включать, без ограничений, один или несколько из следующего: сигнальная последовательность; точка начала репликации; один или несколько маркерных генов; пригодные контрольные элементы транскрипции (такие как промоторы, энхансеры и 20 терминатор). Для экспрессии (т.е., трансляции) также обычно требуются один или несколько контрольных элементов трансляции, таких как сайты связывания рибосом, сайты инициации трансляции, и стоп-кодоны.

Вектора, содержащие полинуклеотиды, представляющие интерес, могут быть введены в клетку-хозяина с помощью любого из ряда соответствующих способов, 25 включая электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию; и инфекцию (например, в тех случаях, когда вектор представляет собой инфекционный агент, такой как вирус коровьей оспы). Выбор (способа) введения вектора или полинуклеотидов будет часто зависеть от 30 характеристик клетки-хозяина.

В некоторых аспектах, изобретение также предусматривает клетки-хозяева, содержащие любые из полинуклеотидов, описанных в данном документе. Любые клетки-хозяева, способные сверхэкспрессировать гетерологичные ДНК, могут быть

использованы с целью выделения генов, кодирующих антитело, полипептид или блок, представляющие интерес. Неограничительные примеры клеток-хозяев млекопитающих включают, без ограничений, клетки COS, HeLa и CHO. См. также публикацию PCT № WO 87/04462. Пригодные клетки-хозяева, не принадлежащие млекопитающим, включают прокариоты (такие как *E. coli* или *B. subtilis*) и дрожжи (такие как *S. cerevisiae*, *S. pombe*; или *K. lactis*). Предпочтительно, клетки-хозяева экспрессируют кДНК на уровне, около в 5 раз выше, более предпочтительно, в 10 раз выше, еще более предпочтительно, в 20 раз выше, чем для соответствующего эндогенного антитела или белка, представляющего интерес, если они присутствуют, в клетках-хозяевах.

Скрининг клеток-хозяев на специфическое связывание с А 9 1-40 проводится путем иммунологического анализ или методом FACS. Клетка, сверхэкспрессирующая антитело или белок, представляющий интерес, может быть идентифицирована.

#### D. Композиции

В некоторых вариантах реализации, композиции, используемые в способе по изобретению, содержат эффективное количество антитела (например, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP) или антитела, полученного из полипептида, описанного в данном документе. Примеры таких композиций, а также способы составления, также описаны в предыдущем разделе и ниже. В одном варианте реализации, композиция дополнительно содержит антагонист CGRP. В некоторых вариантах реализации, композиция содержит один или несколько моноклональных антител, которые модулируют путь CGRP. В некоторых вариантах реализации, композиция содержит один или несколько антагонистических антител против CGRP. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP распознает человеческий CGRP. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP является гуманизированным. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP включает константную область, которая не инициирует ненужного или нежелательного иммунного ответа, такого как медируемый антителом лизис или ADCC. В некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP включает один или несколько CDR(s) антитела G1 (например, один, два, три, четыре, пять или, в некоторых вариантах реализации, все шесть CDR G1). В

некоторых вариантах реализации, антагонистическое антитело против CGRP является человеческим.

Следует понимать, что композиции могут содержать более одного антитела (например, более одного антагонистического антитела против CGRP - смесь антагонистических антител против CGRP, распознающую разные эпитопы CGRP). Другие типичные примеры композиций содержат несколько антагонистических антител против CGRP, которые распознают один и тот же эпитоп (одни и те же эпитопы), или разные виды антагонистических антител против CGRP, которые связываются с разными эпитопами CGRP.

Композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover). Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Терapeutическая композиция антитела может содержать один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов или стабилизаторов, причем неограничительные примеры таких веществ включают буферы, такие как фосфатный, цитратный, и на основе других органических кислот; соли, такие как хлорид натрия; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид, бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты (например, в концентрации от 0,1 мМ до 100 мМ, от 0,1 мМ до 1 мМ, от 0,01 мМ до 50 мМ, от 1 мМ до 50 мМ, от 1 мМ до 30 мМ, от 1 мМ до 20 мМ, от 10 мМ до 25 мМ) такие как глицин, глутамин, метионин, аспарагин, гистидин, аргинин, или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу, или декстрины; хелатирующие агенты (например, в концентрации от 0,001 мг/мл до 1 мг/мл, от 0,001 мг/мл до 1 мг/мл, от 0,001 мг/мл до 0,1 мг/мл, от 0,001 мг/мл до 0,01 мг/мл) такие как ЭДТА (например, динатрия ЭДТА дигидрат); сахара (например, в концентрации от 1 мг/мл до 500 мг/мл, от 10 мг/мл до 200 мг/мл, от 10 мг/мл до 100 мг/мл, от 50 мг/мл до 150 мг/мл), такие

как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества (например, в концентрации от 0,01 мг/мл до 10 мг/мл, от 0,01 мг/мл до 1 мг/мл, от 0,1 мг/мл до 1 мг/мл, от 0,01 мг/мл до 0,5 мг/мл) такие как твин (TWEEN<sup>TM</sup>) (например, полисорбат (например, полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80)), плуроник (PLURONICS<sup>TM</sup>) или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Фармацевтически приемлемые эксципиенты дополнительно описаны в данном документе.

Антитело (например, антагонистическое антитело против CGRP) и его композиции также могут использоваться в сочетании с другими агентами, служащими для усиления и/или дополнения эффективности агентов.

#### Е. Наборы

В одном аспекте, изобретение также предусматривает наборы для использования в способах по настоящему изобретению. Наборы могут включать один или несколько контейнеров, содержащих антитело, описанное в данном документе (например, антагонистическое антитело против CGRP (такое как гуманизированное антитело)), или полипептид, описанный в данном документе, и инструкции по использованию в соответствии с любым из способов, описанных в данном документе.

В общем, такие инструкции содержат описание введения антитела для лечения, облегчения или предотвращения головной боли (такой как мигрень) в соответствии с любым из способов, описанных в данном документе. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивидуума, пригодного для лечения, основанное на идентификации индивидуума, страдающего от головной боли или индивидуума с риском возникновения головной боли. В других вариантах реализации, инструкции содержат описание введения антитела (например, антагонистического антитела против CGRP) индивидууму с риском возникновения головной боли (такой как мигрень).

В некоторых вариантах реализации, антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах реализации, антитело является человеческим. В других вариантах реализации, антитело представляет собой моноклональное антитело. В других вариантах реализации. В некоторых вариантах реализации, антитело содержит один или несколько CDR(s) антитела G1 (например,

один, два, три, четыре, пять или, в некоторых вариантах реализации, все шесть CDR G1).

Инструкции, касающиеся использования антитела (например, антагонистического антитела против CGRP) обычно включают информацию о дозировке, схеме приема, и пути введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут быть разовыми дозами, упаковками большого размера (например, многодозовые упаковки) или дробными дозами. Инструкции, вкладываемые в наборы, типично представляют собой письменные инструкции на ярлыке или на вкладыше в упаковку (например, бумажный лист, входящий в набор), но также приемлемыми являются машиносчитываемые инструкции (например, инструкции на магнитном или оптическом запоминающем диске).

Ярлык или вкладыш в упаковку указывает, что композиция используется для лечения, облегчения и/или предотвращения головной боли (такой как мигрень). Могут быть предусмотрены инструкции по реализации любого из способов, описанных в данном документе.

Наборы по настоящему изобретению находятся в пригодной упаковке. Пригодная упаковка включает, без ограничений, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметизированные лавсановые (Mylar) или пластиковые пакеты) и т.п.. Также предусматриваются упаковки для использования в комбинации с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или инфузионное устройство, такое как насос minipump. Набор может иметь стерильный входной порт (например, контейнер может быть пакетом с раствором для внутривенного введения или флаконом с пробкой, протыкаемой иглой для подкожной инъекции). Контейнер может также иметь стерильный входной порт (например, контейнер может быть пакетом с раствором для внутривенного введения или флаконом с пробкой, протыкаемой иглой для подкожной инъекции). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антагонистическое антитело против CGRP и/или моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP. Контейнер может дополнительно содержать второй фармацевтически активный агент.

Наборы могут необязательно предусматривать дополнительные компоненты, такие как буферы и интерпретирующая информация. Нормально, набор содержит контейнер и ярлык или вкладыш(и) в упаковку на контейнере или связанные с ним .

Следующие примеры приведены для иллюстрации изобретения, без его ограничения.

### Примеры

#### 5 Пример 1: Получение и характеристика моноклональных антител, направленных против CGRP

Получение антитела против CGRP. Для получения антител против CGRP, обладающих перекрестно-видовой реактивностью по отношению к CGRP крысы и человека, мышей иммунизировали 25-100 мкг человеческого  $\alpha$ -CGRP или  $\beta$ -CGRP, конъюгированного с KLH в адьюванте (50 мкл на подушечку лапы, 100 мкл в общем на мышь) с различными интервалами. Иммунизация в общем проводилась, как описано в Geerligts HJ et al., 1989, J. Immunol. Methods 124:95-102; Kenney JS et al., 1989, J. Immunol. Methods 121:157-166; и Wicher K et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89:128-135. Мышей сначала иммунизировали 50 мкг человеческого  $\alpha$ -CGRP или  $\beta$ -CGRP, конъюгированного с KLH в CFA (полный адьювант Фрейнда). Через 21 день мышей иммунизировали повторно 25 мкг человеческого  $\beta$ -CGRP (для мышей, сначала иммунизированных человеческим  $\alpha$ -CGRP) или  $\alpha$ -CGRP (для мышей, сначала иммунизированных человеческим  $\beta$ -CGRP), конъюгированными с KLH в IFA (неполный адьювант Фрейнда). Через двадцать три дня после повторной иммунизации, проводили третью иммунизацию 25 мкг  $\alpha$ -CGRP крысы, конъюгированным с KLH в IFA. Через десять дней, титры антитела определяли с помощью ИФА. Четвертую иммунизацию проводили с использованием 25 мкг пептида (крысиный  $\alpha$ -CGRP-KLH) в IFA через 34 дня после третьей иммунизации. Конечную бустерную иммунизацию проводили с использованием 100 мкг растворимого пептида (крысиный  $\alpha$ -CGRP) через 25 32 дня после четвертой иммунизации.

Спленоциты получали из иммунизированной мыши и сливали с клетками миеломы NSO в соотношении 10:1, с полиэтиленгликолем 1500. Гибриды высевали на 96-луночные планшеты в среду DMEM, содержащую 20 % сыворотку лошади и 2-оксалоацетат/пируват/инсулин (Sigma), и начинали селекцию гипоксантином/аминоптеринном/тимидином. В день 8 во все лунки добавляли 100 мкл DMEM, содержащей 20 % сыворотку лошади. Супернатанты гибридов подвергали скринингу методом иммунологического анализа с ловушкой для антитела.

Определение класса антитела проводили с использованием класс-специфических вторых антител.

Панель клеточных линий, продуцирующих моноклональное антитело, выбирали на основании их связывания с человеческим и крысиным CGRP для проведения дополнительных анализов. Эти антитела и характеристики приведены ниже в Таблицах 2 и 3.

Очистка и получение фрагмента Fab. Моноклональные антитела, выбранные для проведения дополнительных анализов, были очищены от супернатантов гибридомных культур методом аффинной хроматографии на белке А. Супернатанты уравнивали при pH 8. Супернатанты затем загружали на колонку с белком A MabSelect (Amersham Biosciences № 17-5199-02), уравниленную с помощью PBS (фосфатно-солевого буфера) при pH 8. Колонку промывали 5 объемами колонки PBS, pH 8. Антитела элюировали 50 mM цитрат-фосфатным буфером, pH 3. Элюированные антитела нейтрализовали 1M фосфатным буфером, pH 8. Очищенные антитела подвергли диализу с PBS, pH 7,4. Концентрации антитела определяли методом ДСН-ПААГ (SDS-PAGE), с использованием калибровочной кривой для мышинового моноклонального антитела.

Fabs получали методом протеолиза папаином полных антител с использованием набора Immunopure Fab (Pierce № 44885) и очищали с помощью хроматографии на белке А в соответствии с инструкциями производителя. Концентрации определяли методом ИФА и/или электрофореза ДСН-ПААГ с использованием стандартного Fab с известной концентрацией (определенной путем аминокислотного анализа), и по A280 с использованием 1OD (1 единица оптической плотности)=0,6 мг/мл (или теоретического эквивалента, определяемого на основании аминокислотной последовательности).

Определение аффинности Fabs. Аффинности моноклональных антител против CGRP определяли при 25 °C или при 37 °C с использованием системы поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore3000™ (Biacore, INC, Piscataway NJ) с подвижным буфером производителя, HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005 % об./об. полисорбата P20). Аффинность определяли путем связывания биотинилированных на N-конце пептидов CGRP (синтезированы по специальному заказу фирмами GenScript Corporation, New Jersey или Global Peptide Services, Colorado) предварительно иммобилизированным стрептавидином на чипе SA

и измерения кинетики связывания антитела Fab титрованием на поверхности CGRP. Биотинилированный CGRP разбавляли HBS-EP и наносили на чип в концентрации менее 0,001 мг/мл. Благодаря использованию переменного времени прохождения по индивидуальным каналам чипа были получены два диапазона плотностей антигена: <50 единиц отклика (RU) для подробных кинетических исследований и около 800 RU для исследований концентрирования и скрининга. Двух- или трехкратные серийные разбавления, типично в диапазоне концентраций 1 мкМ - 0,1 нМ (около соответствующие 0,1-10х ожидаемым значениям  $K_D$ ), очищенных фрагментов Fab впрыскивали на 1 минуту при расходе 100  $\mu$ л/мин, и наблюдали диссоциацию в течение 10 минут. После каждого цикла связывания, поверхности регенерировали 25 мМ NaOH в 25 % об./об. этаноле, который позволял проводить измерения на протяжении сотен циклов. Кинетические константы ассоциации ( $k_{on}$ ) и константы диссоциации ( $k_{off}$ ) получали одновременно путем аппроксимации данных по уравнению модели 1:1 связывания Лэнгмюра (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) с помощью программы VIAevaluation. Глобальные равновесные константы диссоциации ( $K_D$ ) или "аффинности" рассчитывали по отношению  $K_D = k_{off}/k_{on}$ . Аффинности мышинных фрагментов Fab представлены в Таблицах 2 и 3.

Картирование эпитопов мышинового антитела против CGRP. Для определения эпитопа человеческого  $\alpha$ -CGRP, с которым связываются антитела против CGRP, аффинности связывания фрагментов Fab с различными фрагментами CGRP измеряли, как описано выше, путем связывания фрагментов аминокислот 19-37 и аминокислот 25-37 биотинилированного на N-конце CGRP на сенсорном чипе SA. Фигура 1 показывает их аффинности связывания, измеренные при 25 °C. Как показано на Фигуре 1, все антитела, за исключением антитела 4901, связываются с фрагментами 19-37 и 25-37 человеческого  $\alpha$ -CGRP с аффинностью, схожей с их аффинностью связывания с полноразмерным человеческим  $\alpha$ -CGRP (1-37). Антитело 4901 связывается с фрагментом 25-37 человеческого  $\alpha$ -CGRP с аффинностью, в шесть раз меньшей, чем при связывании с фрагментом полноразмерного человеческого  $\alpha$ -CGRP, преимущественно из-за снижения скорости диссоциации. Данные показывают, что эти антитела против CGRP обычно связываются с C-концевой областью CGRP.

Проводили аланиновое сканирование для дополнительного определения аминокислот человеческого  $\alpha$ -CGRP, участвующих в связывании антитела против

CGRP. Разные варианты человеческого  $\alpha$ -CGRP с одним замещением аланина были получены методом пептидного синтеза. Их аминокислотные последовательности представлены в Таблице 4 вместе со всеми другими пептидами, используемыми в анализе Viacore. Аффинности фрагментов Fab антител против CGRP по отношению к этим вариантам определяли с использованием Viacore, как описано выше. Как показано на Фигуре 1, все 12 антител нацелены на C-концевой эпитоп, причем аминокислота F37 является наиболее важным остатком. Мутация F37 на аланин значительно снижала аффинность или даже полностью ингибировала связывание антител против CGRP с пептидом. Следующим по важности аминокислотным остатком является G33, однако, замещение на аланин в этом положении влияло только на высокоаффинные антитела (7E9, 8B6, 10A8 и 7D11). Аминокислотный остаток S34 также играет значительную, но меньшую, роль в связывании этих четырех высокоаффинных антител.

15

Таблица 2. Характеристики связывания моноклональных антител против CGRP с человеческим  $\alpha$ -CGRP и их антагонистическая активность

Антитела	K <sub>D</sub> с человеческим $\alpha$ -CGRP при 25 °C (нМ)	K <sub>D</sub> с человеческим $\alpha$ -CGRP при 37 °C (нМ)	Блокирование клетками связывания человеческого $\alpha$ -CGRP с его рецептором при 25 °C (измеренное по активации cAMP)	IC <sub>50</sub> (нМ связывающих сайтов) при 25 °C (комнатная температуры), измеренная по анализу связывания радиолигандов.
7E9	1,0	0,9	Да	2,5
8B6	1,1	1,2	Да	4,0
10A8	2,1	3,0	Да	н.о.
7D11	4,4	5,4	Да	н.о.
6H2	9,3	42	Да	12,9
4901	61	139	Да	58
14E10	80	179	Да	н.о.
9B8	85	183	Нет	н.о.
13C2	94	379	Нет	н.о.
14A9	148	581	Нет	н.о.
6D5	210	647	Нет	н.о.
1C5	296	652	Нет	н.о.

20 Примечание: Антитело 4901 является коммерчески доступным (Sigma, Product No. C7113).

н.о. = не определено

Таблица 3. Характеристики связывания моноклональных антител против CGRP с крысиным  $\alpha$ -CGRP и антагонистическая активность

Антитела	$K_D$ с крысиным $\alpha$ -CGRP при 37 °C (нМ)	Блокирование клетками связывания крысиного $\alpha$ -CGRP с его рецептором при 25 °C (измеренное по активации cAMP)	In vivo блокирование в анализе на подкожном нерве
4901	3,4	Да	Да
7E9	47	Да	Да
6H2	54	Нет	Нет
8B6	75	Да	Да
7D11	218	Да	Да
10A8	451	Нет	н.о.
9B8	876	Нет	н.о.
14E10	922	Нет	н.о.
13C2	> 1000	Нет	н.о.
14A9	> 1000	Нет	н.о.
6D5	> 1000	Нет	н.о.
1C5	> 1000	Нет	н.о.

"н.о." указывает, что тестирование антитела не проводилось.

5

Таблица 4. Аминокислотные последовательности фрагментов человеческого  $\alpha$ -CGRP (SEQ ID NOS:15-40) и родственные пептиды (SEQ ID NOS:41-47). Все пептиды амидированы на С-конце, за исключением SEQ ID NOS:36-40. Остатки, выделенные жирным шрифтом, указывают точечные мутации.

10

CGRP	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
1-37 (WT) (дикий тип)	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF	15
8-37	VTHRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF	16
19-37	SGGVVKNFVPTNVGSKAF	17
P29A (19-37)	SGGVVKNFVATNVGSKAF	18
K35A (19-37)	SGGVVKNFVPTNVGSAAF	19
K35E (19-37)	SGGVVKNFVPTNVGSEAF	20
K35M (19-37)	SGGVVKNFVPTNVGSMFAF	21
K35Q (19-37)	SGGVVKNFVPTNVGSQLAF	22
F37A (19-37)	SGGVVKNFVPTNVGSKAA	23
25-38A	NNFVPTNVGSKAFA	24
25-37	NNFVPTNVGSKAF	25
F27A (25-37)	NNAVPTNVGSKAF	26
V28A (25-37)	NNFAPPTNVGSKAF	27
P29A (25-37)	NNFVATNVGSKAF	28
T30A (25-37)	NNFVPANVGSKAF	29

CGRP	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
N31A (25-37)	NNFVPTAVGSKAF	30
V32A (25-37)	NNFVPTNAGSKAF	31
G33A (25-37)	NNFVPTNVASKAF	32
S34A (25-37)	NNFVPTNVGAKAF	33
F37A (25-37)	NNFVPTNVGSKAA	34
26-37	NFVPTNVGSKAF	35
19-37-COOH	SGGVVKNNFVPTNVGSKAF	36
19-36-COOH	SGGVVKNNFVPTNVGSKA	37
1-36-COOH	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGSKA	38
1-19-COOH	ACDTATCVTHRLAGLLSRS	39
1-13-COOH	ACDTATCVTHRLA	40
крысиный $\alpha$ (1-37)	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSEAF	41
крысиный $\alpha$ (19-37)	SGGVVKDNFVPTNVGSEAF	42
человеческий $\beta$ (1-37)	ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKSNNFVPTNVGSKAF	43
крысиный $\beta$ (1-37)	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSKAF	44
Человеческий кальцитонин (1-32)	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	45
Человеческий амилин (1-37)	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNGAILSSTNVGSNTY	46
Человеческий адреномедуллин (1-52)	YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTCTVQKLANQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY	47

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

Мышиные антитела против CGRP были подвергнуты дополнительному скринингу на антагонистическую активность *in vitro* с использованием анализа клеточной активации cAMP и анализа связывания.

Антагонистическую активность измеряли с помощью анализа cAMP. Пять микроролитров человеческого или крысиного  $\alpha$ -CGRP (конечная концентрация 50 нМ) в присутствии антитела против CGRP (конечная концентрация 1-3000 нМ) или без него, или крысиного  $\alpha$ -CGRP или человеческого  $\alpha$ -CGRP (конечная концентрация 0,1 нМ-10  $\mu$ М; в качестве положительного контроля активации c-AMP) дозировали на 384-луночный планшет (Nunc, Cat. № 264657). Десять микроролитров клеток (человеческих SK-N-MC в случае использования человеческого  $\alpha$ -CGRP, или крысиных L6 от ATCC в случае использования крысиного  $\alpha$ -CGRP) в буфере для стимуляции (20 мМ HEPES, pH 7,4, 146 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, и 500 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX)) добавляли в лунки планшета. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин.

После инкубации, проводили активацию cAMP с использованием системы для анализа HitHunter™ Enzyme Fragment Complementation Assay (Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями производителя. Анализ основан на использовании генетически модифицированного фермента β-галактозидазы, который состоит из двух фрагментов, называемых акцептор фермента (EA) и донор фермента (ED). Когда эти два фрагмента разделены, фермент неактивен. Когда фрагменты соединены, они могут спонтанно рекомбинировать с образованием активного фермента в результате процесса, называемого комплементация. Платформа для анализа EFC использует пептидный конъюгат ED-cAMP, в котором cAMP распознается (антителом) против cAMP. Этот фрагмент ED способен к повторной ассоциации с EA с образованием активного фермента. При анализе, антитело против cAMP оптимально титруют для связывания с конъюгатом ED-cAMP и ингибирования образования фермента. cAMP, присутствующий в образцах клеточного лизата, конкурируют с конъюгатом ED-cAMP за связывание с антителом против cAMP. Количество свободного конъюгата ED в анализе пропорционально концентрации cAMP. Таким образом, cAMP измеряют по образованию активного фермента, который количественно определяется по превращению люминесцентного субстрата β-галактозидазы. Анализ активации cAMP проводили путем прибавления 10 мкл буфера для лизиса и антитела против cAMP (в соотношении 1:1) с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 60 мин. Затем прибавляют 10 μл реагента ED-cAMP в каждую лунку и инкубируют в течение 60 минут при комнатной температуре. После инкубации, прибавляют в каждую лунку 20 мкл реагента EA и смесь CL (содержащую субстрат) (в соотношении 1:1) и инкубируют в течение 1-3 часов или в течение ночи при комнатной температуре. Планшет считывают со скоростью 1 секунда/лунку на инструменте PMT или 30 секунд/участок на фотоприемнике (imager). Антитела, которые ингибируют активацию cAMP с помощью α-CGRP, были идентифицированы (обозначены "Да") в Таблицах 2 и 3 выше. Данные в Таблицах 2 и 3 показывают, что антитела, демонстрирующие антагонистическую активность при анализе, обычно обладают высокой аффинностью. Например, антитела, имеющие  $K_D$  (определенную при 25 °C), равную около 80 нМ или меньше с человеческим α-CGRP, или имеющие  $K_D$  (определенную при 37 °C), равную около 47 нМ или меньше с крысиным α-CGRP, проявляют антагонистическую активность в данном анализе.

Анализ связывания радиолиганда. Анализ связывания проводили для измерения  $IC_{50}$  антитела против CGRP при блокировании связывания CGRP с рецептором, как описано выше. Zimmermann et al., *Peptides* 16:421-4, 1995; Mallee et al., *J. Biol. Chem.* 277:14294-8, 2002. Мембраны (25 мкг) клеток SK-N-MC инкубировали в течение 90 мин при комнатной температуре в буфере для инкубации (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % БСА (бычий сывороточный альбумин)), содержащем 10 пМ <sup>125</sup>I-человеческий α-CGRP в общем объеме 1 мл. Для определения ингибирующих концентраций ( $IC_{50}$ ), антитела или немеченый CGRP (в качестве контроля), из около 100-кратно концентрированного маточного раствора растворяли с разными концентрациями в буфере для инкубации и инкубировали в тоже самое время с мембранами и 10 пМ <sup>125</sup>I-человеческим α-CGRP. Инкубацию прекращали фильтрацией через фильтр из стеклянного микроволокна (GF/B, 1 мкм), блокированный 0,5 % полиэтиленimina. Строили графики кривых доза-ответ и значения  $K_i$  определяли с использованием уравнения:  $K_i = IC_{50}/(1+([лиганд]/K_D))$ ; где константа равновесной диссоциации  $K_D = 8$  пМ для человеческого α-CGRP с рецептором CGRP1, присутствующим в клетках SK-N-MC, и  $V_{max} = 0,025$  пмоль/мг белка. Указанное значение  $IC_{50}$  (для молекул IgG) пересчитывали для связывающих сайтов (путем его умножения на 2), чтобы его можно было сравнивать с аффинностями ( $K_D$ ), определенными с помощью Biacore (см. Таблицу 2).

В Таблице 2 приведены значения  $IC_{50}$  для мышиных антител 7E9, 8B6, 6H2 и 4901. Данные указывают, что аффинность антитела обычно коррелирует с  $IC_{50}$ : Антитела с более высокой аффинностью (более низкими значениями  $K_D$ ) имеют более низкие значения  $IC_{50}$  в анализе связывания радиолиганда.

### Пример 3: Эффект антагонистических антител против CGRP на вазодилатацию кожи, индуцируемую стимуляцией подкожного нерва крысы

Для тестирования антагонистической активности антитела против CGRP, эффект антител на вазодилатацию кожи путем стимуляции подкожного нерва крысы тестировали с использованием крысиной модели, описанной ранее. Escott et al., *Br. J. Pharmacol.* 110:772-776, 1993. В этой крысиной модели, электрическая стимуляция подкожного нерва индуцирует высвобождение CGRP нервными окончаниями, приводя к усилению кожного кровотока. Кровоток в коже лапы самцов крыс Sprague Dawley (170-300 г, из Charles River Hollister) измеряли после стимуляции подкожного нерва.

Крыс поддерживали под анестезией с помощью 2 % изофлурана. Бретилия тозилат (30 мг/кг, внутривенное (в/в) введение) давали в начале эксперимента для минимизации вазоконстрикции вследствие сопутствующей стимуляции симпатических волокон подкожного нерва. Температуру тела поддерживали при 37 °С путем использования ректального зонда, термостатически соединенного с грелкой-матрацем с контролируемой температурой. Соединения, включая антитела, положительный контроль (CGRP 8-37), и носитель (PBS, 0,01 % Tween 20) вводили внутривенно через правую бедренную вену, за исключением эксперимента, представленного на Фигуре 3, тестируемое соединение и контроль вводили инъекцией через хвостовую вену, и для экспериментов, представленных на Фигурах 2А и 2В, антитела 4901 и 7D11 вводили инъекцией интраперитонеально (IP). Соединение положительного контроля CGRP 8-37 (антагонист вазодилатации), из-за его короткого периода полувыведения, давали за 3-5 мин до стимуляции нерва в количестве 400 нмоль/кг (200  $\mu$ л). Tan et al., Clin. Sci. 89:656-73, 1995. Антитела давали в разных дозах (1 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг и 25 мг/кг).

Для экспериментов, представленных на Фигурах 2А и 2В, антитело 4901 (25 мг/кг), антитело 7D11 (25 мг/кг), или контрольный носитель (PBS с 0,01 % Tween 20) вводили интраперитонеально (IP) за 72 часа до электроимпульсной стимуляции. Для эксперимента, представленного на Фигуре 3, антитело 4901 (1 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг или 25 мг/кг) или контрольный носитель (PBS с 0,01 % Tween 20) вводили внутривенно за 24 часа до электроимпульсной стимуляции. После введения антител или контрольного носителя, подкожный нерв правой задней лапы обнажали хирургически, перерезали проксимально и накрывали полимерной пленкой для предотвращения высыхания. Лазерный доплеровский зонд помещали на медиодорсальную часть кожи задней лапы, которая является областью, иннервируемой подкожным нервом. Кожный кровоток, измеряемый как поток кровяных клеток, контролировали с помощью лазерного доплеровского флоуметра. После установления стабильного базового потока (отклонения менее 5 %) в течение по меньшей мере 5 мин, нерв помещали на платиновые биполярные электроды и электрически стимулировали 60 импульсами (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с) и затем (стимуляцию) повторяли через 20 минут. Кумулятивное изменение кожного кровотока оценивали по площади под кривой зависимости потока от времени (AUC, равна изменению потока, умноженному на изменение времени) для каждого отклика потока

на электроимпульсную стимуляцию. Рассчитывали средний отклик кровотока на две стимуляции. Животные находились под анестезией в течение периода времени от одного до трех часов.

Как показано на Фигуре 2А и Фигуре 2В, увеличение кровотока, стимулируемое  
5 путем воздействия на подкожный нерв электрическими (electronic) импульсами, ингибировалось в присутствии CGRP 8-37 (400 нмоль/кг, в/в введение), антитела 4901 (25 мг/кг, ip (интраперитонеальное) введение), или антитела 7D11 (25 мг/кг, ip введение) по сравнению с контролем. CGRP 8-37 вводили за 3-5 мин до стимуляции подкожного нерва; и антитела вводили за 72 часа до стимуляции подкожного нерва.  
10 Как показано на Фигуре 3, увеличение кровотока, стимулируемое воздействием на подкожный нерв электрическими импульсами, ингибировалось в присутствии антитела 4901 в разных дозах (1 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг и 25 мг/кг), введенного внутривенно за 24 ч до стимуляции подкожного нерва.

Для экспериментов, представленных на Фигурах 4А и 4В, подкожный нерв  
15 обнажали хирургически перед введением антитела. Подкожный нерв правой задней лапы обнажали хирургически, перерезали проксимально и накрывали полимерной пленкой для предотвращения высыхания. Лазерный доплеровский зонд помещали на медиодорсальную часть кожи задней лапы, которая является областью, иннервируемой подкожным нервом. Кожный кровоток, измеряемый как поток  
20 кровяных клеток, контролировали с помощью лазерного доплеровского флоуметра. Через период времени от тридцати до сорока пяти минут после инъекции бретилия тозилата, когда устанавливался стабильный базовый поток (отклонения менее 5 %) в течение по меньшей мере 5 мин, нерв помещали на платиновые биполярные электроды и электрически стимулировали (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с) и (стимуляцию)  
25 повторяли через 20 минут. Среднее значение отклика величины кровотока на эти две стимуляции использовали для определения базового отклика (момент времени 0) на электрическую стимуляцию. Затем вводили внутривенном (в/в) антитело 4901 (1 мг/кг или 10 мг/кг), антитело 7E9 (10 мг/кг), антитело 8В6 (10 мг/кг) или носитель (PBS с 0,01 % Tween 20). Нерв затем стимулировали (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с) через 30  
30 мин, 60 мин, 90 мин и 120 мин после введения антитела или носителя. Животных выдерживали под анестезией в течение приблизительно трех часов. Кумулятивное изменение кожного кровотока оценивали по площади под кривой зависимости потока

от времени (AUC, равняется изменению потока, умноженному на изменение времени) для каждого отклика потока на электроимпульсную стимуляцию.

Как показано на Фигуре 4А, увеличение кровотока, стимулируемое воздействием на подкожный нерв электрическими импульсами, в значительной степени ингибировалось в присутствии антитела 4901, 1 мг/кг, введенного внутривенно (в/в), при проведении электроимпульсной стимуляции через 60 мин, 90 мин и 120 мин после введения антитела, и увеличение кровотока, стимулируемое воздействием на подкожный нерв электрическими импульсами, в значительной степени ингибировалось в присутствии антитела 4901, 10 мг/кг, введенного внутривенно (в/в), при проведении электроимпульсной стимуляции через 30 мин, 60 мин, 90 мин, и 120 мин после введения антитела. Фигура 4В показывает, что увеличение кровотока стимулируемое воздействием на подкожный нерв электрическими импульсами, в значительной степени ингибировалось в присутствии антитела 7Е9 (10 мг/кг, в/в введение) при проведении электроимпульсной стимуляции через 30 мин, 60 мин, 90 мин, и 120 мин после введения антитела, и в присутствии антитела 8В6 (10 мг/кг, в/в введение) при проведении электроимпульсной стимуляции через 30 мин после введения антитела.

Эти данные указывают, что антитела 4901, 7Е9, 7D11 и 8В6 эффективно блокируют активность CGRP, измеряемую по вазодилатации кожи, индуцированной стимуляцией подкожного нерва крысы.

#### Пример 4. Характеризация антитела G1 против CGRP и его вариантов

Аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела G1 против CGRP представлены на Фигуре 5. Для экспрессии и характеристики антитела G1 и его вариантов использовались следующие способы.

Используемый экспрессионный вектор. Экспрессия фрагмента Fab антител находилась под контролем промотора IPTG lacZ, схожего с описанным в Barbas (2001) Phage display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press pg. 2.10. Vector pComb3X), однако, модификации включали добавление и экспрессию следующих дополнительных доменов: человеческий константный домен легкой цепи каппа и константный домен CH1 человеческого иммуноглобулина IgG2, область C цепи гамма-2 Ig, белок с номером доступа P01859;

легкая цепь каппа иммуноглобулина (*Homo sapiens*), белок с номером доступа CAA09181.

Маломасштабное получение Fab. Из *E. coli*, трансформированных (с использованием или компетентных для электропорации клеток TG1 или компетентных для химических методов клеток Top 10) с помощью библиотеки Fab, использовались отдельные колонии для инокуляции как мастер-планшета (агар LB + карбенициллин (50 мкг/мл) + 2 % глюкозы), так и рабочего планшета (2 мл/лунку, 96 лунок/планшет), где каждая лунка содержала 1,5 мл LB + карбенициллин (50 мкг/мл) + 2 % глюкозы. Планшет покрывали газопроницаемой клейкой герметизирующей пленкой (ABgene, Surrey, UK). Оба планшета инкубировали при 30 °C в течение 12-16 ч; рабочий планшет энергично встряхивали. Мастер-планшет хранили при 4 °C до необходимости, в то время как клетки с рабочего планшета осаждали центрифугированием (4000 об/мин, 4 °C, 20 мин) и ресуспендировали в 1,0 мл LB + карбенициллин (50 мкг/мл) + 0,5 мМ IPTG для индуцирования экспрессии Fabs путем энергичного встряхивания в течение 5 ч при 30 °C. Индуцированные клетки центрифугировали при 4000 об/мин, 4 °C, в течение 20 мин, и ресуспендировали в 0,6 мл буфере HB-SEP Biacore (10 мМ HEPES pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005 % об./об. P20). Лизис ресуспендированных в HB-SEP клеток проводили путем замораживания (-80 °C) и затем оттаивания при 37 °C. Клеточные лизаты центрифугировали при 4000 об/мин, 4 °C, в течение 1 часа для отделения обломков от содержащих Fab супернатантов, которые затем фильтровали (0,2 мкм) с использованием аналитической системы для фильтрации 96-луночных планшетов Millipore MultiScreen Assay System 96-Well Filtration Plate и вакуумного манифолда. Для анализа профильтрованных супернатантов использовали Biacore путем их пропускания над CGRPs на сенсорном чипе. Выбранные по аффинности клоны, экспрессирующие Fabs, выделяли из мастер-планшета, и использовали для получения матричной ДНК для ПЦР, секвенирования и приготовления плазмид.

Крупномасштабное получение Fab. Для определения кинетических параметров, Fabs экспрессировали в больших масштабах следующим образом. Колбы Эрленмайера, содержащие 150 мл LB + карбенициллин (50 мкг/мл) + 2 % глюкозы, инокулировали 1 мл “закваски”, представляющей собой ночную культуру выбранного по аффинности клона экспрессирующего Fab *E. coli*. Остаток культуры-закваски (ок. 3 мл) использовали для приготовления ДНК-плазмиды (QIAprep mini-prep, набор фирмы

Qiagen) для секвенирования и дополнительных манипуляций. Большую культуру инкубировали при 30 °С при энергичном встряхивании до достижения значения оптической плотности  $OD_{600nm}$ , равного 1,0 (типично 12-16 ч). Осадок клеток собирали центрифугированием при 4000 об/мин, 4 °С в течение 20 мин, и ресуспендировали в 150 мл LB + карбенициллин (50 мкг/мл) + 0,5 мМ IPTG. После 5 ч экспрессии при 30 °С, клетки собирали центрифугированием при 4000 об/мин, 4 °С в течение 20 мин, ресуспендировали в 10 мл буфера HBS-EP Bioscote, и лизировали с использованием одного цикла замораживание (-80 °С)/оттаивание (37 °С). Осадок клеточных лизатов собирали центрифугированием при 4000 об/мин, 4 °С в течение 1 часа, и супернатант собирали и фильтровали (0,2 мкм). Профильтрованные супернатанты загружали на колонки с сефарозным сорбентом Ni-NTA superflow sepharose (Qiagen, Valencia, CA), уравновешенные PBS, pH 8, затем промывали 5 объемами колонки PBS, pH 8. Индивидуальные Fabs элюировались в разные фракции с помощью PBS (pH 8) + 300 мМ имидазола. Фракции, содержащие Fabs, объединяли и диализировали в PBS, затем количественно определяли методом ИФА перед анализами аффинности.

Получение полного антитела. Для экспрессии полеоно антитела, переменные участки тяжелой и легкой цепей клонировали в экспрессионные вектора млекопитающих и трансфицировали с использованием липофектамина в клетки НЕК 293 для транзientной экспрессии. Антитела очищали с помощью белка А с использованием стандартных способов.

Вектор pDb.CGRP.hFcG1 представляет собой экспрессионный вектор, содержащий тяжелую цепь антитела G1, и является пригодным для транзientной или стабильной экспрессии тяжелой цепи. Вектор pDb.CGRP.hFcG1 имеет нуклеотидные последовательности, соответствующие следующим областям: промоторная область мышинного цитомегаловируса (нуклеотиды 7-612); синтетический интрон (нуклеотиды 613-1679); кодирующая область DHFR (нуклеотиды 688-1253); сигнальный пептид человеческого гормона роста (нуклеотиды 1899-1976); переменная область тяжелой цепи G1 (нуклеотиды 1977-2621); константная область тяжелой цепи человеческого IgG2, содержащая следующие мутации: A330P331 на S330S331 (нумерация аминокислот в соответствии с последовательностью IgG2 дикого типа; см. Eug. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624). Вектор pDb.CGRP.hFcG1 был депонирован в ATCC 15 июля 2005 г., и ему был присвоен номер доступа ATCC PTA-6867.

Вектор pEb.CGRP.hKGI представляет собой экспрессионный вектор, содержащий легкую цепь антитела G1, и является пригодным для транзientной экспрессии легкой цепи. Вектор pEb.CGRP.hKGI имеет нуклеотидные последовательности, соответствующие следующим областям: промоторная область мышиноного цитомегаловируса (нуклеотиды 2-613); интрон человеческого EF-1 (нуклеотиды 614-1149); сигнальный пептид человеческого гормона роста (нуклеотиды 1160-1237); вариабельный участок легкой цепи антитела G1 (нуклеотиды 1238-1558); константная область человеческой цепи каппа (нуклеотиды 1559-1882). Вектор pEb.CGRP.hKGI был депонирован в ATCC 15 июля 2005 г., и ему был присвоен номер доступа ATCC PTA-6866.

Анализ Вiasоге для определения аффинности. Аффинности моноклонального антитела G1 и его вариантов определяли при 25 °С или 37 °С с использованием системы поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Вiasоге3000™ (Вiasоге, INC, Piscataway NJ). Аффинность определяли путем связывания биотинилированного на N-конце CGRP или фрагментов с предварительно иммобилизированным стрептавидином (сенсорный чип SA) и измерения кинетики связывания фрагментов Fab антитела G1 или вариантов, титруемых по CGRP или фрагменту на чипе. Все анализы Вiasоге проводили в подвижном буфере HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005 % об./об. полисорбата P20). Поверхности с CGRP готовили путем разведения N-биотинилированного CGRP до концентрации менее 0,001 мг/мл в буфере HBS-EP и впрыскивания на сенсорный чип SA с использованием переменных значений времени контакта. Поверхности с низкой емкостью, соответствующие уровням связывания <50 единиц отклика (RU), использовались для кинетических исследований с высоким разрешением, в то время как поверхности с высокой емкостью (около 800 RU связанного CGRP) использовались исследований концентраций, скрининга и определений аффинности в растворе. Кинетические данные были получены путем серийного разведения Fab антитела G1 с двух- или трехкратным шагом в диапазоне концентраций 1 мкМ - 0,1 нМ (соответствует диапазону 0,1-10х расчетных  $K_D$ ). Образцы типично впрыскивают на 1 минуту при объемном расходе 100  $\mu$ л/мин и время наблюдения диссоциации составляло по меньшей мере 10 минут. После каждого цикла связывания, поверхности регенерировали 25 mM NaOH в 25 % об./об. этаноле, что позволяло проводить сотни циклов измерений. Полную концентрационную зависимость, полученную в результате титрования (типично для двух параллельных

экспериментов) глобально аппроксимировали уравнением для модели 1:1 связывания Лэнгмюра с использованием программы *BiAevaluation*. В результате этого получали уникальную пару кинетических констант скорости ассоциации и диссоциации (соответственно,  $k_{on}$  и  $k_{off}$ ) для каждого связывающего взаимодействия, отношение которых дает константу равновесной диссоциации ( $K_D = k_{off}/k_{on}$ ). Аффинности (значения  $K_D$ ), определенные таким образом, приведены в Таблицах 6 и 7.

Анализ связывающих взаимодействий с высокой разрешающей способностью для очень низких скоростей диссоциации. Для взаимодействий с крайне низкими скоростями диссоциации (в частности, для связывания Fab антитела G1 с человеческим  $\alpha$ -CGRP на чипе при 25 °C) аффинности получали с помощью двухстадийного эксперимента. Использовали описанный выше протокол со следующими модификациями. Константу скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) определяли путем впрыскивания серийных растворов для титрования с 2-кратным разбавлением (два параллельных измерения) в диапазоне концентраций 550 нМ-1 нМ в течение 30 с при объемном расходе 100 мкл/мин и продолжительности фазы диссоциации всего 30 с. Константу скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) определяли путем впрыскивания трех концентраций (высокой, средней и низкой) из этой же серии растворов для титрования с двумя параллельными измерениями в течение 30 с при продолжительности фазы диссоциации 2 часа. Аффинность ( $K_D$ ) каждого взаимодействия получали путем объединения значений  $k_{on}$  и  $k_{off}$ , полученных в обоих типах экспериментов, как показано в Таблице 5.

Определение аффинности раствором методом *Biacore*. Аффинность антитела G1 в растворе для крысиного  $\alpha$ -CGRP и F37A (19-37) человеческого  $\alpha$ -CGRP измеряли методом *Biacore* при 37 °C. Использовали поверхность CGRP-чипа с высокой емкостью (для детектирования был выбран высокоаффинный человеческий  $\alpha$ -CGRP) и подвижный буфер HBS-EP подавали с объемным расходом 5 мкл/мин. Фрагмент Fab антитела G1 при постоянной концентрации 5 нМ (которая должна быть близкой к или ниже ожидаемого для взаимодействий в растворе значения  $K_D$ ) предварительно инкубировали с конкурирующим пептидом, представляющим собой крысиный  $\alpha$ -CGRP или F37A (19-37) человеческого  $\alpha$ -CGRP, при конечных концентрациях в диапазоне от 1 нМ до 1 мкМ с 3-кратными серийными разбавлениями. Растворы Fab антитела G1, в отсутствие или при присутствии в растворе конкурирующего пептида, впрыскивали на CGRP на чипе и контролировали истощение связывающих откликов, детектируемых на

поверхности чипа, в результате конкуренции в растворе. Такие связывающие отклики преобразовывали в “концентрации свободного Fab” с использованием калибровочной кривой, которую строили путем титрования отдельно взятого Fab антитела G1 (5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,325 и 0 нМ) на CGRP на чипе. Строили график зависимости “концентраций свободного Fab” от концентрации конкурирующего в растворе пептида, используемого для получения каждой точки данных, и аппроксимировали уравнением для модели аффинности в растворе с использованием программы BIAevaluation. Аффинности в растворе, определенные (косвенно) таким образом, представлены в Таблицах 5 и 7 и использовались для подтверждения аффинностей, полученных при впрыскивании Fabs непосредственно на N-биотинилированные CGRPs на SA-чипе. Близкое совпадение между значениями аффинности, определенными этими двумя способами, подтверждает, что фиксация N-биотинилированного варианта CGRP на чипе не изменяет его нативную активность связывания в растворе.

Таблица 5 ниже показывает аффинности связывания антитела G1 с человеческим  $\alpha$ -CGRP, человеческим  $\beta$ -CGRP, крысиным  $\alpha$ -CGRP и крысиным  $\beta$ -CGRP, определенные методом Biacore путем пропускания потока фрагментов Fab над N-биотинилированным CGRP на SA-чипе. Для того, чтобы лучше разделить аффинности связывающих взаимодействий, имеющих крайне низкие скорости диссоциации, аффинности были также определены путем проведения двухстадийного эксперимента, дополняющего это направление анализа, и была также определена аффинность взаимодействия крысиного  $\alpha$ -CGRP в растворе (как описано выше). Близкое совпадение аффинностей, измеренных в обоих ориентациях анализа, подтверждает, что аффинность связывания нативного крысиного  $\alpha$ -CGRP в растворе не изменяется, если его N-биотинилировать и закрепить на SA-чипе.

25

Таблица 5. Аффинности связывания Fabs антитела G1, определенные путем титрования CGRPs на чипе

CGRP на чипе	Темп. (°C)	$k_{on}$ (1/Мс)	$k_{off}$ (1/с)	$K_D$ (нМ)
Человеческий $\alpha$ -CGRP	25	$1,86 \times 10^5$	$7,80 \times 10^{-6}$	0,042 (7 %, n=4)*
Человеческий $\alpha$ -CGRP	37	$5,78 \times 10^5$	$3,63 \times 10^{-5}$	0,063 (4 %, n=2)*
Человеческий $\beta$ -CGRP	37	$4,51 \times 10^5$	$6,98 \times 10^{-5}$	0,155
Крысиный $\alpha$ -CGRP	25	$5,08 \times 10^4$	$6,18 \times 10^{-5}$	1,22 (12 %, n=2)*
Крысиный $\alpha$ -CGRP	37	$1,55 \times 10^5$	$3,99 \times 10^{-4}$	2,57* ( $K_D$ в растворе=10 (50 %, n=4)**)
Крысиный $\beta$ -CGRP	37	$5,16 \times 10^5$	$7,85 \times 10^{-5}$	0,152

\*Аффинности  $\alpha$ -CGRPs (крысиного и человеческого) определяли путем проведения двухстадийного эксперимента с высокой разрешающей способностью, в котором фазу диссоциации контролировали в течение 2 часов (значения  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ , и  $K_D$  являются средними для  $n$  параллельных измерений, стандартное отклонение выражено как процент дисперсии). Аффинности для  $\beta$ -CGRPs (крысиного и человеческого) определяли путем глобального анализа с использованием фазы диссоциации продолжительностью всего 20 мин, который не позволял проводить точное количественное определение из крайне (низких) скоростей диссоциации (их скорости диссоциации, вероятно, ниже, чем указано в данном документе, поэтому их аффинности, вероятно, имеют еще более высокие значения). Fab антитела G1 диссоциировал крайне медленно со всеми CGRPs (за исключением крысиного  $\alpha$ -CGRP) и имел скорости диссоциации, приближающиеся к пределу разрешения анализа Biacore (особенно при 25 °C).

\*\*Аффинность в растворе, определенная по измерениям истощения откликов связывания, детектируемых для CGRP на чипе по отношению к Fab антитела G1, предварительно инкубированному с раствором конкурента крысиного  $\alpha$ -CGRP.

В Таблице 6 ниже приведены антитела, имеющие вариации аминокислотной последовательности по сравнению с антителом G1, и их аффинности по отношению к крысиному  $\alpha$ -CGRP и человеческому  $\alpha$ -CGRP. Все аминокислотные замещения вариантов, представленных в Таблице 6, описываются по сравнению с последовательностью G1. Аффинности связывания фрагментов Fab определяли методом Biacore путем пропускания их потока над CGRPs на SA-чипе.

Таблица 6. Аминокислотные последовательности и данные по аффинностям связывания для вариантов антитела G1, определенным при 37 °C методом Biacore.

Клон	L1	L2	H2	HC-FW3	$\alpha$ -крысиный $k_{off}$ (1/c)	$\alpha$ -крысиный $K_D$ (нМ)	$\alpha$ -человеческий $k_{off}$ (1/c)	$\alpha$ -человеческий $K_D$ (нМ)
G1					$3,99 \times 10^{-4}$	2,57	$3,63 \times 10^{-5}$	0,063
M1				A100L	$1,10 \times 10^{-3}$		$1,73 \times 10^{-4}$	
M2				L99A A100R	$2,6 \times 10^{-3}$	58	$3,1 \times 10^{-4}$	3
M3				L99A A100S	$2,0 \times 10^{-3}$	61	$2,1 \times 10^{-4}$	1,7
M4				L99A A100V	$1,52 \times 10^{-3}$	84,4	$6,95 \times 10^{-5}$	0,43
M5				L99A	$7,35 \times 10^{-4}$	40,8	$3,22 \times 10^{-5}$	0,20

Клон	L1	L2	H2	HC-FW3	$\alpha$ -крысиный $K_{off}$ (1/c)	$\alpha$ - крысиный $K_D$ (нМ)	$\alpha$ - человеческий $K_{off}$ (1/c)	$\alpha$ - человеческий $K_D$ (нМ)
				A100Y				
M6				L99N	$7,84 \times 10^{-4}$	43,6	$1,33 \times 10^{-4}$	0,83
M7				L99N A100C	$9,18 \times 10^{-4}$	51,0	$2,43 \times 10^{-4}$	1,52
M8				L99N A100G	$7,45 \times 10^{-4}$	41,4	$9,20 \times 10^{-5}$	0,58
M9				L99N A100Y	н.о.	н.о.	$1,00 \times 10^{-5}$	0,06
M10				L99S A100S	$1,51 \times 10^{-3}$	83,9	$1,73 \times 10^{-4}$	1,08
M11				L99S A100T	$4,83 \times 10^{-3}$	268,3	$2,83 \times 10^{-4}$	1,77
M12				L99S A100V	$1,94 \times 10^{-3}$	107,8	$1,01 \times 10^{-4}$	0,63
M13				L99T A100G	$1,84 \times 10^{-3}$	102,2	$1,86 \times 10^{-4}$	1,16
M14				L99T A100K	н.о.	н.о.	$1,00 \times 10^{-5}$	0,06
M15				L99T A100P	$1,15 \times 10^{-3}$	63,9	$1,58 \times 10^{-5}$	0,10
M16				L99T A100S	$9,96 \times 10^{-4}$	55,3	$1,65 \times 10^{-4}$	1,03
M17				L99T A100V	$2,06 \times 10^{-3}$	114,4	$1,85 \times 10^{-4}$	1,16
M18				L99V A100G	$1,22 \times 10^{-3}$	67,8	$7,03 \times 10^{-5}$	0,44
M19				L99V A100R	н.о.	н.о.	$1,00 \times 10^{-5}$	0,06
M20	R28W			L99R A100L	$1,44 \times 10^{-3}$	80,0	$1,36 \times 10^{-4}$	0,85
M21	R28W			L99S	$6,95 \times 10^{-4}$	<u>15,2</u>	$1,42 \times 10^{-4}$	<u>1,23</u>
M22	R28W			L99T	$1,10 \times 10^{-3}$	61,1	$1,16 \times 10^{-4}$	0,73
M23	R28G			L99T A100V	$7,99 \times 10^{-4}$	44,4	$1,30 \times 10^{-4}$	0,81
M24	R28L			L99T A100V	$1,04 \times 10^{-3}$	57,8	$1,48 \times 10^{-4}$	0,93
M25	R28N			L99T A100V	<u><math>1,4 \times 10^{-3}</math></u>	<u>76</u>	<u><math>1,4 \times 10^{-4}</math></u>	<u>1,3</u>
M26	R28N		A57G	L99T A100V	$9,24 \times 10^{-4}$	51,3	$1,48 \times 10^{-4}$	0,93
M27	R28N T30A			L99T A100V	$3,41 \times 10^{-3}$	189,4	$3,57 \times 10^{-4}$	2,23
M28	R28N T30D		E54R A57N	L99T A100V	$1,25 \times 10^{-3}$	69,4	$9,96 \times 10^{-5}$	0,62
M29	R28N T30G			L99T A100V	$3,59 \times 10^{-3}$	199,4	$3,80 \times 10^{-4}$	2,38
M30	R28N T30G		E54K A57E	L99T A100V	$6,38 \times 10^{-3}$	354,4	$5,90 \times 10^{-4}$	3,69
M31	R28N T30G		E54K A57G	L99T A100V	$3,61 \times 10^{-3}$	200,6	$3,47 \times 10^{-4}$	2,17
M32	R28N T30G		E54K A57H	L99T A100V	$2,96 \times 10^{-3}$	164,4	$2,71 \times 10^{-4}$	1,69
M33	R28N T30G		E54K A57N	L99T A100V	$9,22 \times 10^{-3}$	512,2	$7,50 \times 10^{-4}$	4,69

Клон	L1	L2	H2	HC-FW3	$\alpha$ -крысиный $K_{off}$ (1/с)	$\alpha$ - крысиный $K_D$ (нМ)	$\alpha$ - человеческий $K_{off}$ (1/с)	$\alpha$ - человеческий $K_D$ (нМ)
			S58G					
M34	R28N T30G		E54K A57N S58T	L99T A100V	$2,17 \times 10^{-3}$	120,6	$6,46 \times 10^{-4}$	4,04
M35	R28N T30G		E54K A57S	L99T A100V	$3,99 \times 10^{-3}$	221,7	$3,39 \times 10^{-4}$	2,12
M36	R28N T30R			L99T A100V	$4,79 \times 10^{-3}$	266,1	$2,39 \times 10^{-4}$	1,49
M37	R28N T30S		A57G	L99T A100V	$1,45 \times 10^{-3}$	80,6	$2,26 \times 10^{-4}$	1,41
M38	R28N T30W			L99T A100V	$5,11 \times 10^{-3}$	283,9	$2,18 \times 10^{-4}$	1,36
M39	R28N	G50A L56T	A57N S58Y	L99T A100V	$9,95 \times 10^{-3}$	552,8	$4,25 \times 10^{-4}$	2,66
M40	R28N	G50A L56T	E54K A57L	L99T A100V	0,36	20000,0	$1,28 \times 10^{-3}$	8,00
M41	R28N	G50A L56T	E54K A57N E64D	L99T A100V	$4,53 \times 10^{-3}$	251,7	$2,10 \times 10^{-4}$	1,31
M42	R28N	G50A L56T	E54K A57N H61F	L99T A100V	$7,52 \times 10^{-3}$	417,8	$4,17 \times 10^{-4}$	2,61
M43	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58C	L99T A100V	$4,53 \times 10^{-3}$	251,7	$2,63 \times 10^{-4}$	1,64
M44	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	<u><math>6,13 \times 10^{-3}</math></u>	<u>443</u>	<u><math>2,10 \times 10^{-4}</math></u>	<u>2,05</u>
M45	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E E64D	L99T A100V	<u><math>5,58 \times 10^{-3}</math></u>	<u>259</u>	<u><math>2,11 \times 10^{-4}</math></u>	<u>1,85</u>
M46	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E H61F	L99T A100V	$2,94 \times 10^{-3}$	163,3	$5,39 \times 10^{-4}$	3,37
M47	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58G	L99T A100V	$8,23 \times 10^{-3}$	457,2	$3,32 \times 10^{-4}$	2,08
M48	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58L	L99T A100V	0,0343	1905,6	$8,42 \times 10^{-4}$	5,26
M49	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58Y H61F	L99T A100V	0,0148	822,2	$5,95 \times 10^{-4}$	3,72
M50	R28N	G50A L56T	E54K A57R	L99T A100V	$5,30 \times 10^{-3}$	294,4	$4,06 \times 10^{-4}$	2,54
M51	R28N	L56I	E54K A57G	L99T A100V	$1,18 \times 10^{-3}$	65,6	$1,31 \times 10^{-4}$	0,82
M52	R28N	L56I	E54K A57N S58A	L99T A100V	$2,29 \times 10^{-3}$	127,2	$2,81 \times 10^{-4}$	1,76
M53	R28N	L56I	E54K A57N	L99T A100V	$1,91 \times 10^{-3}$	106,1	$3,74 \times 10^{-4}$	2,34

Клон	L1	L2	H2	HC-FW3	$\alpha$ -крысиный $K_{off}$ (1/с)	$\alpha$ - крысиный $K_D$ (нМ)	$\alpha$ - человеческий $K_{off}$ (1/с)	$\alpha$ - человеческий $K_D$ (нМ)
			S58G					
M54	R28N T30A	G50A	E54K A57N S58P	L99T A100V	$2,16 \times 10^{-3}$	120,0	$1,79 \times 10^{-3}$	11,19
M55	R28N T30A	L56S	E54K A57N S58E E64D	L99T A100V	$5,85 \times 10^{-3}$	325,0	$4,78 \times 10^{-4}$	2,99
M56	R28N T30D	L56S	E54K A57N H61F	L99T A100V	$9,35 \times 10^{-3}$	519,4	$4,79 \times 10^{-4}$	2,99
M57	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58E	L99T A100V	<u>0,0104</u>	<u>1,200</u>	<u><math>3,22 \times 10^{-4}</math></u>	<u>3,08</u>
M58	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58I H61F	L99T A100V	Нет связывания	н.о.	$1,95 \times 10^{-3}$	12,19
M59	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58N H61F	L99T A100V	0,0123	683,3	$5,24 \times 10^{-4}$	3,28
M60	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58R H61F	L99T A100V	0,0272	1511,1	$9,11 \times 10^{-4}$	5,69
M61	R28N T30G	A51H	E54Q A57N H61F	L99T A100V	$5,21 \times 10^{-3}$	289,4	$4,59 \times 10^{-4}$	2,87
M62	R28N T30G	A51H L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	<u><math>5,75 \times 10^{-3}</math></u>	<u>242</u>	<u><math>5,57 \times 10^{-4}</math></u>	<u>5,86</u>
M63	R28N T30G	G50A	E54K A57N S58T	L99T A100V	$2,65 \times 10^{-3}$	147,2	$1,50 \times 10^{-3}$	9,38
M64	R28N T30G	G50A	E54K A57N S58V	L99T A100V	0,0234	1300,0	$1,32 \times 10^{-3}$	8,25
M65	R28N T30G	G50A L56I	E54K A57C	L99T A100V	$4,07 \times 10^{-3}$	226,1	$8,03 \times 10^{-4}$	5,02
M66	R28N T30G	L56I	E54K A57E	L99T A100V	$5,11 \times 10^{-3}$	283,9	$5,20 \times 10^{-4}$	3,25
M67	R28N T30G	L56I	E54K A57F	L99T A100V	$1,71 \times 10^{-3}$	95,0	$8,20 \times 10^{-4}$	5,13
M68	R28N T30G	L56I	E54K A57N S58D E64D	L99T A100V	$6,76 \times 10^{-3}$	375,6	$4,28 \times 10^{-4}$	2,68
M69	R28N T30G	L56I	E54K A57N S58E	L99T A100V	$1,81 \times 10^{-3}$	100,6	$7,33 \times 10^{-4}$	4,58
M70	R28N T30G	L56I	E54K A57S	L99T A100V	$6,07 \times 10^{-3}$	337,2	$5,59 \times 10^{-4}$	3,49
M71	R28N T30G	L56I	E54K A57Y	L99T A100V	$2,12 \times 10^{-3}$	117,8	$1,28 \times 10^{-3}$	8,00

Клон	L1	L2	H2	HC-FW3	$\alpha$ -крысиный $k_{off}$ (1/с)	$\alpha$ -крысиный $K_D$ (нМ)	$\alpha$ -человеческий $k_{off}$ (1/с)	$\alpha$ -человеческий $K_D$ (нМ)
M72	R28N T30G	L56S	E54K	L99T A100V	$3,95 \times 10^{-3}$	219,4	$4,00 \times 10^{-4}$	2,50
M73	R28N T30G	L56S	E54K A57N S58Y E64D	L99T A100V	$3,00 \times 10^{-3}$	166,7	$2,55 \times 10^{-4}$	1,59
M74	R28N T30G	L56S	E54K A57S	L99T A100V	$6,03 \times 10^{-3}$	335,0	$5,97 \times 10^{-4}$	3,73
M75	R28N T30G	L56S	E54K A57V	L99T A100V	$1,87 \times 10^{-2}$	1038,9	$1,16 \times 10^{-3}$	7,25
M76	R28N T30S	G50A L56T	A57G	L99T A100V	$1,16 \times 10^{-3}$	64,4	$3,64 \times 10^{-4}$	2,28
M77	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57D	L99T A100V	0,0143	794,4	$4,77 \times 10^{-4}$	2,98
M78	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57N S58T	L99T A100V	0,167	9277,8	$1,31 \times 10^{-3}$	8,19
M79	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57P	L99T A100V	0,19	10555,6	$1,29 \times 10^{-3}$	8,06
M80	R28N T30S	L56I	E54K A57N S58V	L99T A100V	0,0993	5516,7	$2,09 \times 10^{-3}$	13,06
M81	R28N T30S	L56S	E54K A57N S58E	L99T A100V	$4,29 \times 10^{-3}$	238,3	$4,90 \times 10^{-4}$	3,06
M82	R28N T30V	A51H L56T	A57N	L99T A100V	$6,99 \times 10^{-3}$	388,3	$8,77 \times 10^{-4}$	5,48
M83	R28N T30V	A51H L56T	E54K A57N S58M H61F	L99T A100V	Нет связывания	н.о.	$9,33 \times 10^{-4}$	5,83
M84	R28N T30V	A51H L56T	E54N A57N	L99T A100V	$1,76 \times 10^{-2}$	977,8	$1,08 \times 10^{-3}$	6,75

Все CDR, включая CDR по системам Kabat и Chothia. Аминокислотные остатки пронумерованы последовательно (см. Фигуру 5). Все клоны имеют последовательности L3+H1+H3, идентичные G1.

- 5  $K_D = k_{off}/k_{on}$ . Все значения  $k_{off}$  определяли в режиме скрининга, за исключением выделенных подчеркиванием, которые были получены путем глобального анализа рядов концентраций Fab (G1 анализировали в режиме высокого разрешения). Таким образом, выделенные подчеркиванием значения  $K_D$  были определены экспериментально путем измерений  $k_{on}$ . Другие значения  $k_{on}$  были приняты равными значениям для M25.

н.о. = не определено

Для определения эпитопа человеческого  $\alpha$ -CGRP, который распознается антителом G1, использовали вышеописанные анализы ViaCore. Человеческий  $\alpha$ -CGRP

был приобретен в виде N-биотинилированного варианта для обеспечения способности к связыванию с высокой аффинностью с сенсорными чипами SA. Определяли связывание фрагмента Fab G1 с человеческим  $\alpha$ -CGRP на чипе в отсутствие или в присутствии пептида CGRP. Типично, раствор пептид/Fab с молярным соотношением 2000:1 (например, 10 мкМ пептида в 50 нМ Fab G1) вводили впрыскиванием на человеческий  $\alpha$ -CGRP на чипе. Фигура 6 показывает процент связывания, блокируемый конкурентным пептидом. Данные, представленные на Фигуре 6, показывают, что пептидами, блокирующими 100 % связывания Fab G1 с человеческим  $\alpha$ -CGRP, являются 1-37 (WT (дикого типа)), 8-37, 26-37, P29A (19-37), K35A (19-37), K35E (19-37), и K35M (19-37) человеческого  $\alpha$ -CGRP; 1-37  $\beta$ -CGRP (WT); 1-37 крысиного  $\alpha$ -CGRP (WT); и 1-37 крысиного  $\beta$ -CGRP (WT). Все эти пептиды амидированы на С-конце. Пептиды F37A (19-37) и 19-37 (последний не амидирован на С-конце) человеческого  $\alpha$ -CGRP также блокировали около от 80 % до 90 % связывания Fab G1 с человеческим  $\alpha$ -CGRP. Пептид 1-36 (не амидированный на С-конце) человеческого  $\alpha$ -CGRP блокировал около 40 % связывания Fab G1 с человеческим  $\alpha$ -CGRP. Пептидный фрагмент 19-36 (амидированный на С-конце) человеческого  $\alpha$ -CGRP; пептидные фрагменты 1-13 и 1-19 человеческого  $\alpha$ -CGRP (оба не амидированы на С-конце); и человеческие амилин, кальцитонин и адреномедуллин (все амидированы на С-конце) не конкурируют со связыванием Fab G1 с человеческим  $\alpha$ -CGRP на чипе. Эти данные демонстрируют, что G1 нацелен на С-концевой эпитоп CGRP, и что как идентичность самого крайнего остатка (F37), так и его амидирование важны для связывания.

Были также определены аффинности связывания Fab G1 с вариантами человеческого  $\alpha$ -CGRP (при 37 °C). В Таблице 7 ниже приведены аффинности, измеренные непосредственно путем титрования связывания Fab G1 с N-биотинилированным человеческим  $\alpha$ -CGRP и вариантами на чипе. Данные в Таблице 7 показывают, что антитело G1 связывается с С-концевым эпитопом, причем F37 и G33 являются наиболее важными остатками. G1 не связывается с CGRP, если на С-конце (амидированном) добавляется дополнительный аминокислотный остаток (аланин).

30

Таблица 7. Аффинности связывания Fab G1 с человеческим  $\alpha$ -CGRP и вариантами, измеренные при 37 °C (их аминокислотные последовательности см. в Таблице 4)

CGRP на чипе	$k_{on}$ (1/Мс)	$k_{off}$ (1/с)	$K_D$ (нМ)
1-37 (WT) (дикий тип)	$4,68 \times 10^5$	$7,63 \times 10^{-5}$	0,16 (высокая разрешающая способность, $K_D = 0,06$ )

CGRP на чипе	$k_{on}$ (1/Мс)	$k_{off}$ (1/с)	$K_D$ (нМ)
19-37	$4,60 \times 10^5$	$7,30 \times 10^{-5}$	0,16
25-37	$3,10 \times 10^5$	$8,80 \times 10^{-5}$	0,28
F27A (25-37)	$3,25 \times 10^5$	$1,24 \times 10^{-4}$	0,38
V28A (25-37)	$3,32 \times 10^5$	$9,38 \times 10^{-5}$	0,28
P29A (25-37)	$2,26 \times 10^5$	$1,78 \times 10^{-4}$	0,79
T30A (25-37)	$1,79 \times 10^5$	$8,41 \times 10^{-5}$	0,47
N31A (25-37)	$2,17 \times 10^5$	$1,14 \times 10^{-4}$	0,53
V32A (25-37)	$2,02 \times 10^5$	$3,46 \times 10^{-4}$	1,71
G33A (25-37)	$2,07 \times 10^5$	0,0291	141
S34A (25-37)	$2,51 \times 10^5$	$7,64 \times 10^{-4}$	3,04
K35A (19-37)	$2,23 \times 10^5$	$2,97 \times 10^{-4}$	1,33
K35E (19-37)	$5,95 \times 10^4$	$5,79 \times 10^{-4}$	9,73
K35M (19-37)	$2,63 \times 10^5$	$1,34 \times 10^{-4}$	0,51
K35Q (19-37)	$1,95 \times 10^5$	$2,70 \times 10^{-4}$	1,38
F37A (25-37)	$8,90 \times 10^4$	$8,48 \times 10^{-3}$	95 ( $K_D$ в растворе = 172 нМ)
38A (25-38A)	-	-	Связывание не детектируется

Приведенные выше данные указывают, что эпитоп, с которым связывается антитело G1, расположен в С-концевой области человеческого  $\alpha$ -CGRP, и аминокислоты 33 и 37 человеческого  $\alpha$ -CGRP являются важными для связывания антитела G1. Для связывания также важно амидирование остатка F37.

Пример 5: Эффект антагонистического антитела G1 против CGRP на вазодилатацию кожи, индуцированную стимуляцией подкожного нерва крысы

Для тестирования антагонистической активности антитела G1 против CGRP, эффект антитела на вазодилатацию кожи стимуляцией подкожного нерва крысы тестировали с использованием крысиной модели, описанной в Примере 3. Вкратце, крыс поддерживали под анестезией с помощью 2 % изофлурана. Бретилия тозилат (30 мг/кг, внутривенное (в/в) введение) давали в начале эксперимента для минимизации вазоконстрикции вследствие сопутствующей стимуляции симпатических волокон подкожного нерва. Температуру тела поддерживали равной 37 °С путем использования ректального зонда, подключенного с помощью термостата к грелке-матрацу с контролируемой температурой. Подкожный нерв правой задней лапы обнажали хирургически, перерезали проксимально и накрывали полимерной пленкой для предотвращения высыхания. Лазерный доплеровский зонд помещали на медиодорсальную часть кожи задней лапы, которая является областью, иннервируемой подкожным нервом. Кожный кровоток, измеряемый как поток кровяных клеток, контролировали с помощью лазерного доплеровского флоуметра. В экспериментах по определению эффектов антитела на протяжении двух часов после

инъекции через от тридцати до сорока пяти минут после инъекции бретилия тозилата, после установления стабильного базового потока (отклонения менее 5 %) в течение по меньшей мере 5 мин, нерв помещали на платиновые биполярные электроды и электрически стимулировали (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с), и (стимуляцию) 5 повторяли через 20 минут. Среднее значение отклика величины кровотока на эти две стимуляции использовали для определения базового отклика (момент времени 0) на электрическую стимуляцию. Затем вводили внутривенно (в/в) антитело G1 (1 мг/кг или 10 мг/кг) или носитель (PBS с 0,01 % Tween 20 в объеме, равном 10 мг/кг G1). Нерв 10 затем стимулировали (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с) в моменты времени 30 мин, 60 мин, 90 мин и 120 мин после введения антитела. Животных выдерживали под анестезией в течение приблизительно трех часов. Кумулятивное изменение кожного кровотока оценивали по площади под кривой зависимости потока от времени (AUC, равняется изменению потока, умноженному на изменение времени) для каждого отклика потока на электроимпульсную стимуляцию.

15 Как показано на Фигуре 7, увеличение кровотока, стимулируемое воздействием на подкожный нерв электрическими импульсами, в значительной степени ингибировалось в присутствии антитела G1 в количестве 1 мг/кг (в/в введение) по сравнению с носителем, при электрической стимуляции подкожного нерва через 90 мин после введения антитела. Увеличение кровотока, стимулируемое воздействием на 20 подкожный нерв электрическими импульсами, в значительной степени ингибировалось в присутствии антитела G1 в дозе 10 мг/кг (в/в введение) по сравнению с носителем, при электрической стимуляции подкожного нерва через 90 минут и 120 минут после введения антитела.

В экспериментах по определению эффектов антител в более отдаленные 25 моменты времени при анализе на подкожной вене, крысам вводили в/в инъекцией указанные дозы антитела за 24 часа или 7 дней до подготовки животного к стимуляции подкожного нерва, как описано выше. В этих экспериментах было невозможно установить базовый отклик индивидуальных крысы на электроимпульсную стимуляцию перед введением дозы, поэтому группы, получавшие лечение, сравнивали 30 с животными, которым вводили носитель (PBS, 0,01 % Tween 20) в моменты времени 24 часа или 7 дней.

Как показано на Фигурах 8А и 8В, увеличение кровотока в дорсомедиальной области кожи задней лапы, вызванное стимуляцией подкожного нерва, в значительной

степени ингибировалось в группах животных, получавших 10 мг/кг или 3 мг/кг G1 в момент времени за 24 часа или 7 дней до стимуляции по сравнению с группами носителя, введение которым осуществлялось в те же моменты времени.

На Фигуре 8С изображен анализ методом аппроксимации кривой данных зависимости отклик-доза, представленных на Фигурах 8А и 8В, для определения дозы, требуемой для концентрации, обеспечивающей 50 % от максимально возможного эффекта ( $EC_{50}$ ). Значение  $EC_{50}$  для момента времени 24 часа равно 1,3 мг/кг, и  $EC_{50}$  для момента времени 7 дней имеет немного более низкое значение (0,8 мг/кг).

10 Пример 6: Острый эффект антагонистического антитела  $\mu$ 7E9 против CGRP в анализе на артерии твердой мозговой оболочки (закрытое черепное окно)

Модель закрытого черепного окна: Целью этого эксперимента было определение острого эффекта антагонистических антител против CGRP и его сравнение с острым эффектом антагониста рецептора CGRP BIBN4096BS. Эксперименты проводили, как описано выше (Williamson et al., Cephalalgia 17(4):518-24 (1997)), со следующими модификациями. Крыс Sprague Dawley (300-400 г) анестезировали с помощью 70 мг/кг пентобарбитала i.p. (интраперитонеально). Анестезию поддерживали с помощью 20 мг/кг/ч пентобарбитала в/в (внутривенно). Крысам вводили канюлю в яремную вену для доставки всех лекарственных препаратов. Кровяное давление контролировали с помощью зонда (катетер mikro-tip, Millar Instruments), который вводили через бедренную артерию в брюшную аорту. Крысам проводили трахеотомию и частоту дыхания поддерживали на уровне 75 вдохов в минуту при объеме 3,5 мл. После фиксации головы в стереотактическом инструменте и снятия скальпа, окно размером 2x6 мм в левой теменной области латерально непосредственно рядом с сагиттальным швом было сделано путем истончения кости с помощью бормашины. С помощью микроманипулятора, платиновый биполярный электрод опускали на поверхность и накрывали тяжелым минеральным маслом. В латеральном положении по отношению к электродному окну создавали другое окно размером 5x6 мм, заполненное тяжелым минеральным маслом, через которое непрерывно контролировали диаметр ветви средней менингеальной артерии (ММА) с помощью ПЗС-камеры и анализатора размеров видеоизображения (Living Systems). После подготовки, крысы отдыхали в течение не менее 45 минут. Устанавливали базовый отклик на электрическую стимуляцию (15 В, 10 Гц, импульсы 0,5 мс, 30 секунд), и затем крысам вводили в/в

тестируемое соединение (10 мг/кг  $\mu$ 7E9, 300 мкг/кг BIBN4096BS или PBS 0,01 % Tween 20). Дополнительную электрическую стимуляцию проводили в моменты времени 5 (BIBN4096BS), 30, 60, 90 и 120 минут после введения дозы. Все данные регистрировали с использованием прикладной программы Chart (ADInstruments).

5 Как показано на Фигуре 9,  $\mu$ 7E9 в дозе 10 мг/кг в значительной степени блокирует дилатацию ММА, вызываемую стимуляцией электрическим полем в течение 60 минут после введения дозы, и поддерживает эффект на протяжении анализа (120 минут). Для сравнения, BIBN4096BS блокирует дилатацию ММА через 5 минут после введения дозы, но эффект полностью исчезал за 90 минут. Величина блокировки сопоставима для BIBN4096BS и  $\mu$ 7E9.

#### Пример 7: Хронический эффект антагонистического антитела G1 против CGRP в артерии твердой мозговой оболочки (закрытое черепное окно) assay

Целью этого эксперимента было определение того, будет ли антитело против CGRP продолжать блокировать электростимулируемую дилатацию ММА через 7 дней после введения дозы. Подготовка крыс была идентична вышеописанному острому эксперименту (Пример 6) со следующими исключениями. Крысам вводили путем в/в инъекции (10 мг/кг, 3 мг/кг или 1 мг/кг G1) за 7 дней до процедуры создания закрытого черепного окна и стимуляции. Было невозможно установить базовый дилатационный отклик на электрическую стимуляцию до введения дозы, как и в остром эксперименте, поэтому группы, получавшие антитело, сравнивали с дилатацией ММА в контрольной группе, получавшей носитель (PBS, 0,01 % Tween 20). После того, как крысам позволяли отдохнуть не менее 45 минут, твердую мозговую оболочку электрически стимулировали с интервалами 30 минут. Стимуляцию проводили при 2,5 В, 5 В, 10 В, 15 В и 20 В, все при 10 Гц, импульсами по 0,5 мс в течение 30 секунд.

Как показано на Фигуре 10, G1 в дозах 10 мг/кг и 3 мг/кг в значительной степени блокировал дилатацию ММА, вызываемую электрической стимуляцией в диапазоне значений от 10 до 20 вольт. Эти данные демонстрируют, что G1 может блокировать стимулируемую электрическими импульсами дилатацию ММА на протяжении до 7 дней после введения дозы.

#### Пример 8: Модель прилива крови после отмены морфина

Модель отмены морфина у крыс представляет собой принятую модель механизмов приливов крови при менопаузе на грызунах (Sipe et al., Brain Res. 1028(2):191-202 (2004); Merchenthaler et al., Maturitas 30:307-316 (1998); Katovich et al., Brain Res. 494:85-94 (1989); Simpkins et al., Life Sciences 32:1957-1966 (1983)). В основном, зависимость крыс от морфина создают путем имплантации гранул морфина под кожу. После установления зависимости, животным делают инъекцию налоксона (опиоидный антагонист), который немедленно вызывает у них абстинентный синдром. Этот абстинентный синдром сопровождается повышением температуры кожи, снижением температуры внутри тела, повышением частоты сердечных сокращений и повышением уровня лютеинизирующего гормона в сыворотке. Все эти признаки по величине и времени проявления схожи с наблюдаемыми при человеческих приливах крови (Simpkins et al., Life Sciences 32:1957-1966 (1983)). Кроме того, если крысам вводят эстрадиол перед индукцией абстинентного синдрома, то симптомы прилива крови уменьшаются (Merchenthaler et al., Maturitas 30:307-316 (1998)). Именно поэтому считается, что модель отмены морфина имитирует клинический прилив крови.

Крыс с удаленными яичниками заказывали у фирмы Charles River Laboratories. Не ранее чем через 7 дней после овариэктомии вызывали морфиновую зависимость путем имплантации подкожно гранулы морфина (75 мг морфиновой основы). Через два дня имплантировали еще 2 гранулы. На следующий день крысам вводили инъекцией внутривенно 10 мг/кг 4901 [\*\*] или носитель (PBS, 0,01 % tween). Через два дня после второй имплантации гранул крыс анестезировали кетаминном (90 мг/кг) и слегка ограничивали в движениях (lightly restrained). Термопару для измерения температуры поверхности тела закрепляли клейкой лентой у основания хвоста и ректальную термопару использовали для измерения внутренней температуры тела. Данные регистрировали с использованием прикладной программы Chart (ADInstruments). После записи в течение 15 минут стабильной базовой температуры вводили инъекцией налоксон (1 мг/кг) подкожно. Температуру регистрировали непрерывно в течение следующих 60 минут. Результаты представлены на Фигурах 11А и 11В.

30

#### Пример 9: Лечение хронической мигрени

Мужчина в возрасте 45 лет был идентифицирован как страдающий от хронической мигрени на протяжении по меньшей мере трех месяцев. Определение наличия

хронической мигрени проводилось путем изучения истории частых головных болей, позволяющих предположить проявление хронической мигрени (например, 15 дней в месяц) на протяжении по меньшей мере трех месяцев перед проведением скрининга. Подтверждение частоты головной боли осуществлялось путем последующего сбора базовой информации, демонстрирующей наличие головных болей в по меньшей мере 5 15 дней, причем по меньшей мере 8 дней в месяц отвечали любому одному из следующих критериев: i. соответствие характеристикам приступа мигрени; и/или ii. предваряются или сопровождаются мигреновой аурой.

Для снижения частоты случаев мигрени у субъекта, субъекту вводили дозу 225 мг антагонистического антитела против CGRP (например, антитела G1).

Антагонистическое антитело против CGRP поставлялось в виде жидкой композиции в концентрации 150 мг/мл. Дозу 225 мг вводили подкожной инъекцией 1,5 мл с задней стороны плеча субъекта. Альтернативно, доза может введена субъекту путем внутривенной инфузии. В таких случаях, 5,85 мл (раствора) 150 мг/мл антитела против 15 CGRP может быть объединено с 0,9 % раствора хлорида натрия (нормальный солевой раствор) в пакете для внутривенного (IV) вливания с общим объемом в пакете 130 мл. 100 мл из объема пакета для внутривенного (IV) вливания вводят субъекту путем внутривенной инфузии на протяжении одного часа, при общей дозе 225 мг. Введение доз повторяют через каждые двадцать восемь дней до тех пор, пока не будет 20 наблюдаться снижение частоты случаев мигрени. Сниженную частоту хронической мигрени анализируют с использованием различных критериев, которые включают число дней головной боли, число часов, когда наблюдаются головные боли (например, часов головной боли), тяжесть головных болей, и число дней мигрени, наблюдаемых у субъекта.

#### 25 Пример 10: Лечение хронической мигрени

Женщина в возрасте 37 лет была идентифицирована как страдающая от хронической мигрени на протяжении по меньшей мере трех месяцев. Определение наличия хронической мигрени проводилось путем изучения истории частых головных болей, позволяющих предположить проявление хронической мигрени (например, 15 дней в 30 месяц) на протяжении по меньшей мере трех месяцев перед проведением скрининга. Подтверждение частоты головной боли осуществлялось путем последующего сбора базовой информации, демонстрирующей наличие головных болей в по меньшей мере 15 дней, причем по меньшей мере 8 дней в месяц отвечали любому одному из

следующих критериев: i. соответствие характеристикам приступа мигрени; и/или ii. предваряются или сопровождаются мигреновой аурой.

Для снижения частоты случаев мигрени у субъекта, субъекту вводили начальную ударную дозу 675 мг антагонистического антитела против CGRP (например, антитела G1). Антагонистическое антитело против CGRP поставлялось в виде жидкой композиции в концентрации 150 мг/мл. Ударную дозу 675 мг вводили в виде трех подкожных инъекций по 225 мг в 1,5 мл в различные области тела субъекта (например, задняя сторона плеча, нижняя часть живота/живот/талия, передняя часть бедра и т.д.). Введение повторяли через каждые двадцать восемь дней в дозах по 225 мг (например, с помощью одной подкожной инъекции 1,5 мл в руку субъекта) до тех пор, пока не будет наблюдаться снижение частоты случаев мигрени. Сниженную частоту хронической мигрени анализируют с использованием различных критериев, которые включают число дней головной боли, число часов, когда наблюдаются головные боли (например, часов головной боли), тяжесть головных болей, и число дней мигрени, наблюдаемых у субъекта.

#### Пример 11: Лечение хронической мигрени

Мужчина в возрасте 23 лет был идентифицирован как страдающий от хронической мигрени на протяжении по меньшей мере трех месяцев. Определение наличия хронической мигрени проводилось путем изучения истории частых головных болей, позволяющих предположить проявление хронической мигрени (например, 15 дней в месяц) на протяжении по меньшей мере трех месяцев перед проведением скрининга. Подтверждение частоты головной боли осуществлялось путем последующего сбора базовой информации, демонстрирующей наличие головных болей в по меньшей мере 15 дней, причем по меньшей мере 8 дней в месяц отвечали любому ОДНОМУ из следующих критериев: i. соответствие характеристикам приступа мигрени; и/или ii. предваряются или сопровождаются мигреновой аурой.

Для снижения частоты случаев мигрени у субъекта, субъекту вводили дозу 900 мг антагонистического антитела против CGRP (например, антитела G1). Антагонистическое антитело против CGRP поставлялось в виде жидкой композиции в концентрации 150 мг/мл. Дозу 900 мг вводили в виде четырех подкожных инъекций по 225 мг в 1,5 мл в различные области тела субъекта (например, задняя сторона плеча,

нижняя часть живота/живот/талия, передняя часть бедра и т.д.). Введение доз повторяют через каждые двадцать восемь дней до тех пор, пока не будет наблюдаться снижение частоты случаев мигрени. Сниженную частоту хронической мигрени анализируют с использованием различных критериев, которые включают число дней 5 головной боли, число часов, когда наблюдаются головные боли (например, часов головной боли), тяжесть головных болей, и число дней мигрени, наблюдаемых у субъекта.

#### Пример 12: Лечение эпизодической мигрени

10 Мужчина в возрасте 28 был идентифицирован как страдающий от эпизодической мигрени с высокой частотой (приступов). Субъектов идентифицировали как страдающих от эпизодической мигрени с высокой частотой приступов с использованием критериев, включающих: наличие истории головных болей в более чем 8 дней в месяц на протяжении по меньшей мере 3 месяцев до проведения 15 скрининга; и подтверждение частоты головных болей путем последующего сбора базовой информации проявление головных болей (любого типа) в течение от 8 до 14 дней, причем по меньшей мере 8 дней отвечают по меньшей мере одному из следующих критериев: i. мигрень; ii. вероятная мигрень; и/или iii. использование триптанов или соединений на основе спорыньи. 20

Для снижения частоты случаев мигрени у субъекта, субъекту вводят дозу 675 мг антагонистического антитела против CGRP (например, антитела G1). Антагонистическое антитело против CGRP поставлялось в виде жидкой композиции в концентрации 150 мг/мл. Дозу 675 мг вводили путем трех 225 мг подкожных инъекций 25 по 1,5 мл в различные области тела субъекта (например, задняя сторона плеча, нижняя часть живота/живот/талия, передняя часть бедра и т.д.). Введение доз повторяют через каждые двадцать восемь дней до тех пор, пока не будет наблюдаться снижение частоты случаев мигрени. Сниженную частоту эпизодической мигрени анализируют с использованием различных критериев, которые включают число дней головной боли, 30 число часов, когда наблюдаются головные боли (например, часов головной боли), тяжесть головных болей, и число дней мигрени, наблюдаемых у субъекта.

#### Пример 13: Лечение эпизодической мигрени

Женщина в возрасте 52 была идентифицирована как страдающая от эпизодической мигрени с высокой частотой приступов. Субъектов идентифицировали как страдающих от эпизодической мигрени с высокой частотой приступов с использованием критериев, включающих: наличие истории головных болей в более чем 8 дней в месяц на протяжении по меньшей мере 3 месяцев до проведения скрининга; и подтверждение частоты головных болей путем последующего сбора базовой информации

5 проявление головных болей (любого типа) в течение от 8 до 14 дней, причем по меньшей мере 8 дней отвечают по меньшей мере одному из следующих критериев: i. мигрень; ii. вероятная мигрень; и/или iii. использование триптанов или соединений на основе спорыньи.

10

Для снижения частоты случаев мигрени у субъекта, субъекту вводили дозу 225 мг антагонистического антитела против CGRP (например, антитела G1). Антагонистическое антитело против CGRP поставлялось в виде жидкой композиции в концентрации 150 мг/мл. Дозу 225 мг вводили подкожной инъекцией 1,5 мл в заднюю часть плеча субъекта. Введение доз повторяют через каждые двадцать восемь дней до тех пор, пока не будет наблюдаться снижение частоты случаев мигрени. Сниженную частоту эпизодической мигрени анализируют с использованием различных показателей, которые включают наблюдения числа дней головной боли, числа часов, когда наблюдаются головные боли (например, часов головной боли), тяжести головных болей, и числа дней мигрени у субъекта.

15

20

#### Пример 14: Неклиническая токсикология и фармакокинетика

Антагонистическое антитело против CGRP G1 хорошо переносилось в ходе проведения исследований токсичности продолжительностью 1 месяц при повторном внутривенном (IV) введении доз крысам Sprague-Dawley (SD) и яванским макакам, и избирательная органная токсичность не наблюдалась в обоих этих исследованиях. Уровень отсутствия нежелательных эффектов (NOAEL) был определен равным 100 мг/кг/неделю по результатам исследований как на крысах, так и на обезьянах. Этот уровень доз соответствовал системной экспозиции с максимальными концентрациями (C<sub>max</sub>), равными 2570 и 3440 мкг/мл, и значениями площадей под кривой (AUC(0-168ч)), равными 194000 мкг•ч/мл и 299000 мкг•ч/мл (день 22) у крыс и обезьян, соответственно.

25

30

В IV/SC (внутривенное/подкожное введение) исследованиях на крысах продолжительностью 3 месяца не наблюдалось избирательной органной токсичности и G1 хорошо переносился до наивысшей тестируемой дозы, равной 300 мг/кг. В исследованиях на обезьянах продолжительностью 3 месяца, периваскулярное

5 воспаление ресничной артерии в результате отложения иммунных комплексов наблюдалось при  $\geq 100$  мг/кг. Этот результат был объяснен иммуногенным ответом обезьян на гуманизированное антитело и не был признан клинически релевантным. Наибольшая тестируемая доза в данных исследованиях на обезьянах, равная 300 мг/кг, по меньшей мере в 10 раз превышает наивысшую ожидаемую клиническую дозу,

10 составляющую 2000 мг или 29 мг/кг в пересчете на удельные величины (принимая средний вес субъектов равным 70 кг).

#### Пример 15: Клиническая фармакокинетика

Фармакокинетику (ПК) антитела G1 после разового внутривенного (IV)

15 введения изучали в четырех рандомизированных двойных слепых исследованиях с контролем по плацебо для доз от 10 до 2000 мг. Максимальные концентрации в плазме (C<sub>max</sub>) достигались вскоре после завершения внутривенной (IV) инфузии продолжительностью 1 час. Медианное время до C<sub>max</sub> (T<sub>max</sub>) имело значения в диапазоне от 1,0 до 3,0 часов, с последующим многоэтапным снижением. C<sub>max</sub> и

20 общая экспозиция увеличивались приблизительно линейно с повышением дозы G1. Конечный период полувыведения (t<sub>1/2</sub>) составлял от 36,4 до 48,3 дней. Данные о метаболизме G1 в печени отсутствуют, первичным является метаболизм путем протеосомальной деградации.

Одно из исследований определяло фармакокинетику для доз 30 мг и 300 мг при

25 введении дважды, с интервалом в две недели. Максимальные концентрации и площадь под профилем концентрация-время увеличивались с повышением дозы. Кажущийся конечный период полувыведения (t<sub>1/2</sub>) после второй дозы составлял 41,2 дней (30 мг) и 50,0 дней (300 мг) (среднее арифметическое). Соотношения накопления в плазме G1 после двух IV доз, введенных с интервалом в 15 дней, составляли 1,5 (30 мг) и 1,4 (300

30 мг).

#### Пример 16: Клиническая безопасность и фармакокинетика

В шести исследованиях, антитело G1 вводили 118 здоровым особам мужского и женского пола, а 57 особ мужского и женского пола получали плацебо. Исследование включало разовые внутривенные (IV) дозы в диапазоне значений от 0,2 мг до 2000 мг, две IV-дозы до 300 мг с введением раз в 14 дней, и подкожное (SC) введение 225 и 900 мг. Шесть исследований включали: два исследования фармакокинетики (PK) и фармакодинамики (PD) при внутривенном (IV) введении разовой дозы с эскалацией здоровым мужчинам (исследования B0141001 и B0141002); перекрестное исследование в двух когортах с контролем по плацебо для изучения острых эффектов IV введения антитела G1 на реакцию вызванного капсаицином покраснения у здоровых добровольцев (B0141006); исследование с параллельными группами с повторным введением доз антитела G1 здоровым добровольцам мужского и женского пола (B0141007); исследование по оценке безопасности и переносимости при внутривенном введении разовой дозы до 2000 мг здоровым добровольцам-женщинам (B0141008), и исследование по сравнению относительной безопасности и биодоступности при внутривенном (IV) и подкожном (SC) введении (G1-SC-IV).

Результаты шести исследований сведены в Таблице 11 ниже. Из пяти исследований с внутривенным введением (B0141001, B0141002, B0141006, B0141007 и B0141008), три имели по существу идентичные планы проведения и оценки. В исследовании B014100 тестировали дозы 0,2 мг, 1 мг и 3 мг, которые вводили путем одной внутривенной (IV) инфузии продолжительностью один час. Исследование имело дизайн с параллельными группами. Участники находились в клинике на протяжении семи дней после инфузии, с проведением многочисленных анализов в каждый из этих дней. После выписки, пациентов повторно осматривали через неделю после выписки (день 14), и затем через один, два и три месяца после инфузии. В исследовании B0141002 тестировали дозы в диапазоне значений от 10 мг до 1000 мг при разовом введении. Наконец, в исследовании B0141008 тестировали дозы 300 мг, 1000 мг, 1500 мг или 2000 мг. Исследование B0141006 отличалось от остальных, потому что оно также было нацелено на включение фармакодинамических показателей, полученных путем измерения ингибирования вызываемого капсаицином покраснения в течение периода времени до одной недели после внутривенной инфузии антитела G1.

Для исследований с внутривенным введением, профили нежелательных эффектов (AEs) регистрировались только для периода после первого введения. В исследовании B0141007 тестировали повторные дозы антитела G1 по 30 или 300 мг

внутривенно с интервалом в две недели, с использованием дизайна с параллельными группами. Каждый пригодный для включения в исследования субъект вносился в рандомизационную последовательность через интерактивную интернет-систему, которая содержала назначение лечения. Схема рандомизации была разработана

5 ведущим статистиком. Участники всех исследований обычно были здоровыми мужчинами и женщинами (в возрасте от 18 до 65 лет); все участники подписывали формы информированного согласия. Все исследования были одобрены наблюдательными советами по проведению исследований (IRBs). Нежелательные

10 эффекты (AEs) были определены как любое неблагоприятное медицинское явление у участников клинических исследований, при наличии причинной связи с исследуемым препаратом или без таковой. Нежелательные эффекты, наблюдавшиеся после введения исследуемого препарата или плацебо назывались "возникшими при лечении" нежелательными эффектами (TEAEs), независимо от потенциальной причинно-следственной зависимости с исследуемым препаратом. За всеми субъектами,

15 испытывавшими TEAEs, велось наблюдение через соответствующие интервалы времени до разрешения эффекта или до стабилизации эффекта и/или до достижения новой базовой линии. Все TEAEs ранжировали на слабые, умеренные или тяжелые. Серьезные нежелательные эффекты (SAEs) были априорно определены как любое нежелательное медицинское явление, которое при любой дозе приводило к смерти,

20 было угрожающим для жизни (т.е. субъект испытывал непосредственную угрозу смерти во время явления), требовало госпитализации пациента или продолжения существующей госпитализации, приводило к стойкой или значительной инвалидности/нетрудоспособности (например, значительное нарушение способности субъекта выполнять нормальные жизненные функции), приводило к пороку

25 развития/врожденному дефекту, или любое другое медицински важное явление. Связанные с лечением нежелательные эффекты (TRAEs) должны были приниматься во внимание в случае возникновения одной из следующих ситуаций: 1) может быть установлена вероятная временная взаимосвязь между началом проявления нежелательного эффекта и введением исследуемого продукта; 2) нежелательный

30 эффект не может быть легко объяснен клиническим состоянием пациента, интеркуррентным заболеванием, или сопутствующими терапиями; 3) нежелательный эффект ослабевает при прекращении применения исследуемого продукта или снижении дозы.

Кровяное давление, частоту пульса и температуру в ротовой полости измеряли при скрининге, перед введением дозы, немедленно после завершения инфузии и многократно во время нахождения пациентов в клиниках, а также при всех посещениях клиники. Лабораторные испытания включали химические показатели сыворотки, гематологию и анализ мочи. Лабораторные испытания гематологии, химии, коагуляции и мочи проводили многократно за время исследований безопасности. ЭКГ регистрировали при скрининге, перед введением дозы в день 1, немедленно после завершения инфузии и еще пять раз на протяжении первого дня, а также при всех посещениях клиники. Значения интервала QT с коррективкой Фридеричия (QTcF) определяли с использованием поправочной формулы частоты сердечных сокращений Фридеричия. Абсолютные значения и отклонения от базовой линии для параметров ЭКГ интервал QT, частота сердечных сокращений, интервал QTcF, интервал PR и интервал QRS оценивали по когортам, способу лечения, и времени после введения дозы. В дополнение к оценкам безопасности, описанным выше, протокол B014008 включал полную офтальмологическую оценку на базовой линии и в три момента времени после введения дозы (день 28, день 84, и день 168).

Клинически данные и основные жизненные показатели обобщали с помощью описательных таблиц и сводных статистических данных. Лабораторные и другие данные по безопасности обобщали как функцию любого изменения (значения, выходящие за пределы нормальной области значений), а также любых клинически релевантных изменений, которые были определены априорно. Сводные таблицы были стратифицированы по дозам и данные для разных исследований объединяли.

Дополнительно, сравнения консолидированных данных для всех экспозиций антитела G1 сравнивали с плацебо. Плацебо также сопоставляли с дозами антитела G1 100 мг и выше (100 мг, 300 мг, 1000 мг, 1500 мг, и 2000 мг), и с дозами антитела G1 1000 мг и выше (1000 мг, 1500 мг, и 2000 мг).

В исследованиях с внутривенным/подкожным (IV/SC) введением (G1-SC-IV), тридцать шесть субъектов рандомизировали по разовому введению антитела G1 (225 или 900 мг) или плацебо, доставляемых с помощью подкожной (SC) болюсной инъекции или внутривенной инфузии продолжительностью 1 час. Субъекты находились в клиническом исследовательском подразделении в течение семи дней после введения дозы, и периодически возвращались в клинику при дополнительных амбулаторных посещениях до дня исследований 90. ЭКГ проводили многократно в день 1 (перед

введением дозы, в часы 1, 6, 12), день 3, день 7, пока субъекты находились в клинике, и один раз при завершении исследований (день 90). Основные жизненные показатели, включая температуру, кровяное давление и частоту сердечных сокращений, определяли перед введением дозы, в дни 1, 3, 7 и 90.

5

10 Таблица 11

Исследование	Популяция исследования	Лечение антителом G1
B0141001	Здоровые взрослые мужчины (n = 24)	Однократная внутривенная (IV) инфузия 0,2, 1 или 3 мг в когортах по восемь (шесть/когорту, активное лечение; два в когорте плацебо)
B0141002	Здоровые взрослые мужчины (n = 40)	Однократная IV инфузия 10, 30, 100, 300 или 1000 мг в когортах по восемь (шесть/когорту, активное лечение; 10 в когорте плацебо)
B0141006	Здоровые взрослые мужчины (n = 12)	Две перекрестно-модифицированные когорты, плацебо или IV инфузия 300 мг в когортах по шесть. В первый период, все участники получали плацебо. Во втором периоде (включен в данное исследование), 12 участников получали плацебо и 11 получали 300 мг.
B0141007	Здоровые взрослые мужчины и женщины (n = 21)	Две внутривенные инфузии с интервалом две недели по 30 или 300 мг в когортах по 10 или 11 (шесть/когорту, активное лечение; девять в когорте плацебо)
B0141008	Здоровые взрослые женщины (n = 31)	Однократная IV инфузия 300, 1000, 1500, или 2000 мг (пять в когорте 2000 мг; шесть/когорту в остальных экспериментальных группах; восемь в когорте плацебо)
G1-SC-IV	Тридцать шесть субъектов (n = 36)	Однократная подкожная (SC) болюсная инъекция или однократная IV инфузия 225 или 900 мг

В широком диапазоне анализируемых доз в пяти исследованиях с внутривенным введением (от 0,2 до 2000 мг), антитело G1 внутривенно имело приемлемую переносимость. В Таблице 8 собраны данные об общей частоте нежелательных эффектов (АЕ) по дозам для исследований с внутривенным введением. На основании этих результатов определения переносимости явные угрозы безопасности не выявлены. По всем испытаниям при исследованиях с внутривенным введением, участники, получавшие плацебо, сообщали в среднем об 1,3 возникших при лечении нежелательных эффектах (TEAEs). Они представляют собой все зарегистрированные эффекты, независимо от мнения исследователей о взаимосвязи с

20

исследуемым препаратом. По всем дозам G1 при внутривенном введении, этот показатель составлял 1,4 TEAEs/субъекта. Субъекты, получавшие дозы G1 100 мг или выше, имели в среднем 1,5 TEAEs; получавшие дозы 1000 мг или выше, имели в среднем 1,6 TEAEs.

5

10

Таблица 8

	Субъекты, анализируемые по нежелательным эффектам	Число АЕ – n (N)	Субъекты с АЕ – n (N)	Субъекты с серьезными АЕ – n (N)	Субъекты с тяжелыми АЕ – n(N)	Субъекты, вышедшие из испытаний из-за АЕ – n (N)	Снижение дозы или временное прекращение приема – n (N)
Плацебо	45	57 (11)	23 (8)	0	0	2 (1)	0
0,2 мг	6	5 (0)	2 (0)	0	0	0	0
1 мг	6	1 (1)	3 (0)	0	0	0	0
3 мг	6	10 (2)	4 (1)	0	0	0	0
10 мг	6	5 (1)	4 (1)	0	0	0	0
30 мг	12	21 (11)	8 (5)	0	0	0	0
100 мг	6	5 (1)	4 (1)	0	0	0	0
300 мг	29	47 (10)	20 (7)	1 (1)	1 (1)	0	0
1000 мг	12	17 (4)	8 (4)	0	0	0	0
1500 мг	6	8 (0)	3 (0)	0	1 (0)	0	0
2000 мг	5	12 (2)	4 (1)	0	0	0	1 (1)

15 АЕ = нежелательные эффекты; n= любые эффекты, независимо от того, связаны они с лечением или нет; (N) = считаются связанными с лечением по мнению исследователя. Примечание: Для протокола В0141006 (плацебо и 300 мг) включены только данные для первого периода активного лечения, из-за его перекрестного характера

20 В исследованиях с внутривенным введением, связанные с лечением нежелательные эффекты (TRAEs, или АЕs, которые могут быть связаны с терапией по мнению главного исследователя) были зарегистрированы у 21,2 % субъектов, получавших внутривенно G1, по сравнению с 17,7 % у получавших плацебо. При дозах

100 мг G1 или выше, TRAEs наблюдались у 22,4 % участников. При дозах 1000 мг или выше, TRAEs наблюдались у 21,7 % участников. Антитело G1, по-видимому, не ассоциировано с какими-либо клинически значимыми изменениями основных жизненных показателей (систолическое и диастолическое кровяное давление [BP], температура и частота сердечных сокращений [HR]), аномалии на электрокардиограмме (ECG) (включая QTcB и QTcF), реакция в месте инфузии, или результаты клинических лабораторных анализов. Наблюдались ограниченные эффекты на тесты функции печени (аспартатаминотрансфераза [AST], аланинаминотрансфераза [ALT], общий билирубин, и щелочная фосфатаза) с увеличением первой степени (grade 1) общего билирубина у одного субъекта, получавшего плацебо (исследование B0141001), и увеличением первой степени (grade 1) ALT у одного субъекта, получавшего плацебо (исследование B0141002). Клинически значимые аномалии функции печени не наблюдались у субъектов, получавших любые исследованные дозы G1. Отсутствуют данные об отличиях между G1 и плацебо по гематологическим тестам оценки функции почек, электролитам, или по тестам мочи.

В исследовании IV/SC (G1-SC-IV), безопасность и переносимость были сопоставимыми для подкожного (SC) и внутривенного (IV) путей доставки. Средняя частота сердечных сокращений и кровяное давление (диастолическое и систолическое) не изменялись при лечении антителом G1, также отсутствовали какие-либо значимые изменения любых сердечно-сосудистых параметров после лечения антителом G1 подкожно (SC). Сводные данные о TRAEs, наблюдаемых в ходе исследований с подкожным введением, приведены ниже в Таблице 12.

Таблица 12

	900 мг (N=6)	225 мг (N=6)	Плацебо (N=6)
Желудочно-кишечные (GI) расстройства	2 (33,3 %)	0	1 (16,7 %)
ЦНС	0	1 (16,7 %)	0
Инфекции и инвазии	0	0	0
Скелетно-мышечная система и соединительная ткань	0	0	0
Дыхательная система	0	0	0
Расстройства репродуктивной системы и молочных желез	0	0	0
Травмы	0	0	0
беременность	0	0	0
Почки	1 (16,7 %)	0	0

Сосудистая система	0	0	0
--------------------	---	---	---

В исследованиях с введением разовой дозы (B0141001, B0141002, B0141006 и B0141008), фармакокинетические (PK) параметры рассчитывали для доз в диапазоне значений от 30 мг до 2000 мг. Средний по группе конечный период полувыведения ( $t_{1/2}$ ) имел значения в диапазоне приблизительно от 40 до 48 дней.  $C_{max}$  и общая экспозиция (оцениваемая по  $AUC_{inf}$ ) возрастали с увеличением дозы. Увеличение  $AUC_{inf}$  было приблизительно пропорционально дозе между 30 и 1000 мг, и возрастало быстрее дозы между 1000 и 2000 мг. Объем распределения был низким, от 6 до 10 л.

В исследовании с введением двух доз (B0141007), кажущийся конечный период полувыведения после второй дозы имел значение в интервале от 41 до 50 дней. Концентрации в плазме накапливались после второй дозы, с коэффициентом накопления приблизительно 1,5. Кроме того, в исследованиях IV/SC (G1-SC-IV), анализ фармакокинетических показателей указывает на то, что G1 при подкожной доставке имеет схожий период полувыведения с внутривенной доставкой.

#### Пример 17: Предотвращение хронической мигрени в клинических исследованиях антитела G1

Многоцентровое рандомизированное двойное слепое многодозовое исследование с двойной имитацией, с контролем по плацебо, с параллельными группами, по сравнению антагонистического антитела против CGRP G1 с плацебо проводили на субъектах с хронической мигренью. Субъекты, допущенные до отбора для участия в исследовании, начинали с базового 28-дневного вводного периода. Получаемая от субъектов информация об их головной боли и состоянии здоровья регистрировалась ежедневно на протяжении исследований, с использованием системы электронного дневника головной боли. На протяжении вводного периода или исследований не допускались изменения в медикаментозном лечении мигрени. Использовались следующие критерии включения: (1) мужчины или женщины в возрасте от 18 до 65 лет; (2) подписанный и датированный документ об информированном согласии, указывающий, что субъект был проинформирован о всех существенных аспектах исследований, включая любые известные и потенциальные риски и доступные альтернативные методы лечения; (3) хроническая мигрень, отвечающая диагностическим критериям, перечисленным в Международной классификации головных болей (International Classification of Headache Disorders,

ICHD-III beta version, 2013); (4) субъекты могут использовать до двух разных ежедневных лекарственных средств для профилактики мигрени (например, топирамат, пропранолол, amitриптилин) или других медицинских состояний (например, пропранолол используется при гипертензии), если доза и схема приема оставались стабильными на протяжении по меньшей мере 2 месяцев до начала 28-дневного вводного периода; (5) индекс массы тела (ИМТ) от 17,5 до 34,5 кг/м<sup>2</sup>, и общая масса тела от 50 кг до 120 кг, включительно; (6) субъект не обладает репродуктивным потенциалом, как определено в способах, или, если субъекты обладают репродуктивным потенциалом, то они соглашаются или на воздержание, или на использование (или на использование их партнером) приемлемого метода контрацепции на протяжении предполагаемой продолжительности исследований; (7) продемонстрированное соблюдение условий использования электронного дневника головной боли на протяжении вводного периода путем введения данных о головной боли минимум в 24/28 дней (уровень соблюдения 85 %). В пункте (3) выше использовались следующие диагностические критерии хронической мигрени: (а) история частых головных болей, позволяющая предположить наличие хронической мигрени (15 дней в месяц) на протяжении по меньшей мере трех месяцев до проведения скрининга; (б) подтверждение частоты головных болей путем последующего сбора базовой информации на протяжении 28-дневной вводной фазы, демонстрирующей головные боли в по меньшей мере 15 дней, причем по меньшей мере 8 дней в месяц отвечают любому одному из следующих критериев (i) могут быть квалифицированы как приступ мигрени, (ii) предваряются или сопровождаются мигреновой аурой, или (iii) облегчаются с помощью соединений спорыньи или производных триптана.

Критерии исключения требовали, чтобы субъекты не соответствовали одному из следующих критериев: (1) начальные проявления хронической мигрени после достижения возраста 50 лет; (2) субъект получал ботокс (onabotulinum toxin A) для лечения мигрени или по любым медицинским или косметическим причинам, требующим инъекции в голову, лицо или шею на протяжении шести месяцев до проведения скрининга; (3) субъект использует лекарственные средства, содержащие опиоиды (включая кодеин) или барбитураты (включая фиоринал (Fiorinal®), фиорацет (Fioracet®), или любую другую комбинацию, содержащую буталбитал) в течение более чем 4 дней в месяц для лечения мигрени или по любой другой причине; (4) неудачное

использование >2 категорий лекарственных средств или >3 профилактических средств (в двух категориях лекарственных средств) вследствие отсутствия эффективности при лечении эпизодической или хронической мигрени после соответствующего пробного курса лечения; (5) клинически значимая гематологическая, почечная, эндокринная, легочная, желудочно-кишечная, мочеполовая, неврологическая или глазная болезнь, на усмотрение исследователя; (6) субъекты со свидетельствами или историей клинически значимых психиатрических проблем, включая глубокую депрессию, паническое расстройство, или генерализованное тревожное расстройство (в соответствии с критериями Диагностического и статистического руководства, 5-е издание (Diagnostic and Statistical Manual 5th edition [DSM-5])); (7) систолическое кровяное давление при скрининге выше 160 мм рт.ст. или ниже 90 мм рт.ст.; (8) диастолическое кровяное давление при скрининге выше 110 мм рт.ст. или ниже 50 мм рт.ст.; (9) история клинически значимой сердечно-сосудистой болезни или сосудистой ишемии (такие как миокардиальной, неврологической [например, церебральная ишемия], периферическая ишемия конечностей, или другие ишемические явления); (10) прошлая или текущая история рака, за исключением субъектов с базальноклеточной карциномой, которая была удалена; (11) беременные или кормящие женщины; (12) история гиперчувствительных реакций на инъекции белков, включая моноклональные антитела; (13) лечение исследовательским лекарственным средством в течение 30 дней перед включением в исследования; (14) клинически значимая аномалия базовой поверхностной ЭКГ в 12 отведениях, включая синусовые паузы >2 секунд, блокада сердца второй или третьей степени или другие аномалии, признанные клинически значимыми исследователем; (15) базовая ЭКГ с 12 отведениями, демонстрирующая QTcF >450 мс для мужчин и 470 мс для женщин при скрининге (если QTcF превышает эти значения, ЭКГ повторяли и среднее из трех значений QTcF использовали для определения потенциальной пригодности субъекта для участия в исследованиях; QTc определяли с использованием формулы Фридеричия); (16) любой результат, который по мнению исследователя клинически значимо отклоняется от нормы, включая гематологические показатели, химические показатели крови, пробы на коагуляцию или анализ мочи (тесты с аномальными результатами было разрешено повторять для подтверждения) (17) печеночные ферменты (аланинаминотрансфераза [ALT], аспаратаминотрансфераза [AST], щелочная фосфатаза) более чем в 1,3 раза превышает верхний предел нормы (ULN) после подтверждения повторным тестом; (18)

креатинин сыворотки более чем в 1,5 раза превышает ULN, клинически значимая протеинурия (полоски для экспресс-анализа мочи +4) или свидетельства болезни почек.

5 Субъектов с подтвержденной хронической мигренью и высокой готовностью к соблюдению правил ведения ежедневного дневника головной боли на протяжении вводного периода рандомизировали во время посещения 2 (день 1) в одну из трех ветвей исследований. Рандомизацию проводили с использованием электронной интерактивной интернет-системы. Субъектов стратифицировали по полу и базовому  
10 медикаментозному лечению мигрени. Лекарственный препарат вводили раз в месяц (каждые 28 дней) для проведения в общей сложности трех сеансов лечения за период 3 месяцев. Введение лекарственного препарата проводилось при посещении 2 (день 1; первая доза), посещении 3 (день 29; вторая доза), и посещении 4 (день 57; третья и последняя доза). Итоговые оценки при завершении исследования определяли при посещении 5 (день 85), приблизительно через 28 дней после третьей и последней дозы.  
15 Инъекции вводили подкожно на протяжении 3-месячного периода (каждые 28 дней) субъектам в каждой из следующих групп: (1) osoby, рандомизированные в ветвь 900 мг, получали четыре активных инъекции каждые 28 дней; (2) osoby, рандомизированные в ветвь 675/225 мг, получали три активных инъекции и одну инъекцию плацебо в первом варианте курса лечения, и одну активную инъекцию и три  
20 инъекции плацебо во втором и третьем вариантах курса лечения; (3) osoby, рандомизированные в группу плацебо, получали четыре инъекции плацебо каждые 28 дней. Активные инъекции содержали 225 мг антитела G1. Конечные точки определяли по электронному ежедневному дневнику головной боли, представляющему собой интерактивную интернет-систему, регистрирующую данные за предшествующий 24-  
25 часовой период. Общая продолжительность головной боли регистрировалась численно, в часах, а также число часов головной боли с каждым уровнем тяжести. Тяжесть головной боли субъективно оценивалась субъектом в предварительно заданные моменты времени следующим образом: отсутствие боли, слабая боль, умеренная боль и тяжелая боль. Субъектов также просили указывать, присутствовали или нет  
30 следующие сопутствующие симптомы в предварительно заданные моменты времени: фотофобия, фонофобия, тошнота, и рвота. Дополнительную конечную точку определяли по контролю использования триптанов (например, суматриптана) в качестве неотложного лекарственного средства против головной боли субъектами,

участвующими в исследовании, на протяжении исследований. Сводные данные и демографические сведения о субъектах, участвующих в исследовании, приведены в Таблице 9.

5 Таблица 9

	<b>Плацебо</b>	<b>675/225 мг</b>	<b>900 мг</b>	<b>Всего</b>
<b>После рандомизации</b>	89	88	87	264
<b>Завершили исследования</b>	77 (86,5 %)	72 (81,8 %)	76 (87,4 %)	225
<b>Анализовались по назначенному лечению (ITT)</b>	89 ( 100 %)	87 (98,9 %)	85 (97,7 %)	261 (98,9 %)
<b>В анализе безопасности</b>	89 ( 100 %)	88 ( 100 %)	86 (98,9 %)	263 (99,6 %)
<b>Не завершили исследования</b>	12 (13,5 %)	16 (18,2 %)	11 (12,6 %)	39 (14,8 %)
<b>Возраст (среднее значение в годах)</b>	40,7	40	41,5	40,75
<b>% женщин</b>	85,4 %	86,3 %	86,2 %	85,9 %
<b>Число лет с мигренью</b>	20,4	15,8	18,7	18,3

Среднее уменьшение числа часов головной боли по сравнению с базовой линией в каждую из недель 1, 2 и 3 (W1, W2, и W3, соответственно) для каждой группы представлено графически на Фиг. 15. Результаты показывают значительное снижение в обеих группах лечения по сравнению с группой плацебо в каждой из точек W1, W2 и W3, включая самую первую неделю.

Среднее снижение числа часов головной боли по сравнению с базовой линией в каждый из месяцев 1, 2, и 3 (M1, M2, и M3, соответственно) для каждой группы представлено графически на Фиг. 12. Результаты показывают значительное снижение в обеих группах лечения по сравнению с группой плацебо во все три момента времени, включая после самой первой дозы. Статистическая значимость по сравнению с группой плацебо для данных на Фиг. 12 указана с помощью приведенных р-значений.

Среднее число часов головной боли в каждой группе на базовой линии, и при посещениях 2, 3, и 4 (V2, V3, и V4, соответственно) представлено графически на Фиг. 13. Результаты показывают значительное снижение в обеих группах лечения по

сравнению с группой плацебо во все три момента времени, включая после самой первой дозы.

Среднее снижение числа дней головной боли умеренной или тяжелой интенсивности по сравнению с базовой линией в каждый из месяцев 1, 2, и 3 (M1, M2, и M3, соответственно) для каждой группы представлено на Фиг. 14. Результаты показывают статистически значимое снижение в обеих группах лечения по сравнению с группой плацебо во все три момента времени, включая после самой первой дозы. Статистическая значимость по сравнению с группой плацебо указана с помощью приведенных р-значений.

Среднее снижение числа случаев использования триптанов в качестве неотложного лекарственного средства по сравнению с базовой линией в каждый из месяцев 1, 2, и 3 (M1, M2, и M3, соответственно) для каждой группы представлено графически на Фиг. 16. Результаты показывают значительное снижение использования триптанов в обеих группах лечения по сравнению с группой плацебо во все три момента времени, включая после самой первой дозы. Статистическая значимость по сравнению с группой плацебо указана с помощью приведенных р-значений на Фиг. 16.

Значимое снижение числа часов головной боли также наблюдалось у субъектов с использованием профилактических средств (например, топирамата и amitриптилина или пропранолола) по сравнению с группой плацебо.

Обе дозы хорошо переносились, и проблемы с безопасностью не возникали. Сводные данные о возникающих при лечении нежелательных эффектах (TEAE) по группам приведены в Таблице 10. Различия между связанными (с применением препарата) TEAE почти полностью объясняются слабыми эффектами, возникающими при инъекциях (эритема, некоторый дискомфорт). Серьезные TEAE не были связаны с лекарственным препаратом (отсутствие связанных с препаратом нежелательных эффектов).

Таблица 10

	Плацебо N (%)	675/225 мг N (%)	900 мг N (%)
<b>TEAE</b>	36 (40,4)	47 (53,4)	41 (47,7)
<b>Связанные (с препаратом) TEAE</b>	15 (16,9)	25 (28,4)	28 (32,6)
<b>Серьезные TEAE</b>	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (2,3)
<b>TEAE, вызывающие прекращение участия в исследованиях</b>	1 (1,1)	6 (6,8)	5 (5,8)

<b>Смертей</b>	0	0	0
----------------	---	---	---

Пример 18: Предотвращение эпизодической мигрени с высокой частотой приступов в клинических исследованиях антитела G1

Многоцентровое рандомизированное двойное слепое исследование с контролем по плацебо, с параллельными группами, по сравнению антитела против CGRP G1 с плацебо проводили на субъектах с эпизодической мигренью с высокой частотой приступов (HFEM). План исследований соответствовал описанному в Примере 17, с двумя отличиями. Во-первых, критерии включения (3) предусматривали субъектов, отвечающих критериям к эпизодической мигрени в соответствии со вторым изданием Международного общества головной боли (Second Edition of The International Headache Society) (Olesen and Steiner 2004), которые испытывали мигрень с высокой частотой приступов, изложенным следующим образом: (a) история головных болей в более чем 8 дней в месяц на протяжении по меньшей мере 3 месяцев до проведения скрининга; (b) подтверждение частоты головных болей путем последующего сбора базовой информации на протяжении 28-дневной вводной фазы о проявлениях головных болей (любого типа) в течение от 8 до 14 дней, причем по меньшей мере 8 дней отвечают критериям по меньшей мере чего-то одного из (i) мигрени, (ii) вероятной мигрени, или (iii) использования триптанов или соединений на основе спорыньи. Во-вторых, были изменены схемы приема для групп, получающих G1. Конкретнее, инъекции вводили подкожно на протяжении периода 3 месяцев (каждые 28 дней) субъектам в каждой из следующих групп: (1) особы, рандомизированные в ветвь 675 мг, получали 675 мг G1 каждые 28 дней; (2) особы, рандомизированные в ветвь 225 мг, получали 225 мг G1 каждые 28 дней; и (3) особы, рандомизированные на плацебо, получали инъекцию плацебо каждые 28 дней. Сводные исходные данные и демографические характеристики субъектов, участвующих в исследованиях, приведены в Таблице 13. Конечные точки исследований включали снижение числа дней мигрени и снижение числа дней головной боли любой тяжести.

30

Таблица 13

	<b>Плацебо</b>	<b>225 мг</b>	<b>675 мг</b>	<b>Всего</b>
<b>После рандомизации</b>	104	96	97	297

<b>Анализировались по назначенному лечению (ITT)</b>	104 (100 %)	95 (99 %)	96 (99 %)	295 (99 %)
<b>В анализе безопасности</b>	104 (100 %)	96 (100 %)	97 (100 %)	297 (100 %)
<b>Возраст (среднее значение в годах)</b>	42,0	40,8	40,7	41,2
<b>% женщин</b>	88 %	91 %	85 %	88 %
<b>% белых</b>	82 %	77 %	76 %	78 %

Среднее снижение числа дней мигрени по сравнению с базовой линией в каждый из месяцев 1, 2, и 3 (M1, M2, и M3, соответственно) для каждой группы представлено на Фиг. 17. Результаты показывают статистически значимое снижение в 5 обеих группах лечения по сравнению с группой плацебо во все три момента времени, включая после самой первой дозы. Статистическая значимость по сравнению с группой плацебо указана с помощью приведенных р-значений.

Среднее снижение числа дней головной боли любой тяжести по сравнению с базовой линией в каждый из месяцев 1, 2, и 3 (M1, M2, и M3, соответственно) для 10 каждой группы представлено на Фиг. 18. Результаты показывают статистически значимое снижение в обеих группах лечения по сравнению с группой плацебо во все три момента времени, включая после самой первой дозы. Статистическая значимость по сравнению с группой плацебо указана с помощью приведенных р-значений.

Обе дозы хорошо переносились, и проблемы с безопасностью не возникали. 15 Сводные данные о возникающих при лечении нежелательных эффектах (TEAE) по группам приведены в Таблице 14. Четыре серьезные случая TEAEs были связаны с одним случаем перелома малоберцовой кости, одним случаем тремора вследствие прекращения приема препарата и двумя случаями мигрени, требующей лечения в палате экстренной помощи (ER).

20

Таблица 14

	<b>Плацебо N ( %)</b>	<b>225 мг N ( %)</b>	<b>675 мг N ( %)</b>
<b>TEAE</b>	58 (56)	44 (46)	57 (59)
<b>Связанные (с препаратом) TEAE</b>	24 (23 %)	26 (27 %)	24 (25 %)
<b>Серьезные TEAE</b>	0	2 (2 %)	2 (2 %)
<b>Связанные (с препаратом) серьезные</b>	0	0	0

<b>TEAE</b>			
<b>TEAE, вызывающие прекращение участия в исследованиях</b>	0	4 (4 %)	2 (2 %)
<b>Смертей</b>	0	0	0

### Пример 19: Неклиническая безопасность

Два исследования по оценке безопасности антитела G1 были проведены на яванских макаках. В первом исследовании оценивали безопасность разовой дозы антитела G1. Во втором исследовании оценивали безопасность повторных доз антитела G1. Каждое из исследований и их результаты дополнительно описаны более подробно ниже. В исследованиях как с разовой, так и повторными дозами, антитело G1 было приготовлено в виде композиции раствора 51,4 мг/мл в 20 мМ гистидина, 84 мг/мл трегалозы дигидрата, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 0,05 мг/мл динатрия ЭДТА дигидрата и 0,1 мг/мл L-метионина, pH около 5,5. Композиция носителя имела идентичный состав, но без антитела G1. Дополнительно, в обоих исследованиях, периодически брали образцы крови для анализа концентрации антитела G1 в плазме с использованием валидированного метода ИФА.

Данные сначала агрегировали в сводные таблицы и фигуры с использованием прикладных программ GraphPad Prism (версия 6.0) и Excel 2010 (Microsoft). Для исследований с однократной экспозицией, телеметрические данные анализировали с использованием дисперсионного анализа (ANOVA). Анализ проводили с использованием прикладной программы SAS Release 8.2. Для нормализации интервала QT по диапазону интервалов R-R, для каждого животного генерировали коэффициенты коррекции для индивидуальных животных (IACFs) путем соотнесения каждого RR-интервала с ассоциированным с ним QT-интервалом. Для набора данных определяли линейную регрессию этого отношения QT/RR-интервалов. Тангенс угла наклона этой линейной регрессии использовали в качестве IACF для соответствующего животного во всех экспериментах. Этот IACF использовали для расчета откорректированного QT-интервала (QTc) с использованием следующего уравнения:

$$QT-I(c) = \text{интервал QT с поправкой на частоту сердечных сокращений} = QT-I - [(RR - 300) * (IACF)].$$

В исследованиях с многократными дозами для анализа данных также использовали однофакторный дисперсионный анализ. Если результат дисперсионного анализа был значимым ( $P \leq 0,05$ ), для сравнения между группами использовали апостериорный критерий Даннета. Для каждого пола, экспериментальную группу

5 сравнивали с контрольной группой (носитель) при 5 % уровне значимости двусторонней вероятности.

#### *Телеметрические исследования с разовой дозой*

Восьми взрослым самцам яванских макак (Charles River Primates)

10 хирургическими методами устанавливали инструменты для телеметрии и давали по меньшей мере две недели на восстановление. Использовали имплантируемые устройства (DSI TL11M2-D70-PCT) и приемники (RMC-1) производства Data Sciences International.

Животным давали акклиматизироваться к клеткам для сбора телеметрических

15 данных по меньшей мере в течение ночи перед введением дозы. Во время акклиматизации проводили предварительную запись гемодинамических параметров для проверки правильности функционирования преобразователей и оборудования. Во время сбора телеметрических данных животные были размещены индивидуально в клетках, оборудованных приёмниками телеметрических данных. В дни, когда сбор

20 данных не проводился, животные находились в клетках без приёмников телеметрических данных. Животные содержались при дневном цикле с 12 часами освещения, 12 часами темноты, со свободным (ad libitum) доступом к воде и получали сертифицированный корм для приматов.

В первой фазе исследований, животным (8 самцов) вводили один лишь

25 носитель, и сбор телеметрических данных начинали около за 1 час перед введением дозы и проводили в течение 22 часов после введения дозы. Через шесть дней после введения носителя, эти же животные получали однократное внутривенное (IV) введение антитела G1 (100 мг/кг, доза, около в 10 раз превышающая фармакологическую EC50 для яванских макак). Телеметрически передаваемые

30 электрокардиографические и гемодинамические данные снова непрерывно регистрировали для всех животных. Дополнительно, за этими животными велось наблюдение в течение около 24 часов в дни 3, 7, 10 и 14 после получения ими разовой дозы антитела G1. Телеметрически передаваемые сигналы ЭКГ и кровяного давления

поступали с имплантированных радиотелеметрических устройств на приемник, установленные в каждой клетке. Принятые сигналы проходили через устройство обмена данных (DSI модель DEM) и далее в систему сбора данных на основе ПК (DSI, программа Ponemah P3 версия 3.4); для анализа данных использовалась программа Emka Technologies версия 2.4.0.20 (Emka Technologies). Частота аналогово-цифровой дискретизации была равна 1000 Гц для телеметрически передаваемых данных ЭКГ и 500 Гц для данных кровяного давления. Данные регистрировали в виде средних значений за 1 мин.

Среднее по группе систолическое кровяное давление (SBP) имело близкие значения до и после лечения антителом G1 на протяжении первого дня после введения дозы и в последующие дни (телеметрические данные животных собирали в дни 3, 7, 10 и 14 с интервалами времени, идентичными использованным в день 1). В часы 1–4 после введения дозы, когда концентрации антитела G1 в крови имели максимальные уровни (средняя концентрация 3500 мкг/мл в момент времени 4 часа), среднее SBP было равно 111 мм рт.ст. по сравнению со 113 мм рт.ст. в тот же интервал времени после введения носителя. Кроме того, SBP было равно 110 мм рт.ст. в дни 3 и 7, 109 мм рт.ст. в день 10, и 110 мм рт.ст. в день 14 после введения антитела G1. Аналогичные данные о SBP были зарегистрированы для других интервалов времени. Поскольку эти исследования проводились по перекрестному (crossover) плану, получавшие препарат животные служили своими собственными контролями. При анализе данных как разностей значений кровяного давления после введения антитела G1 по сравнению с введением носителя, имеются несущественные статистически значимые снижения SBP в последний интервал времени в дни 7, 10 и 14.

Было обнаружено, что после лечения антителом G1, диастолическое кровяное давление (DBP) было около на 3 мм рт.ст. ниже средних значений, полученных после введения носителя. С часов 5–22, средние по группам значения для групп носителя и антитела G1 имели схожие значения. Такая же тенденция наблюдалась в другие дни, когда незначительное снижение DBP (в диапазоне значений 2,62–3,5 мм рт.ст.) наблюдалось в первый интервал измерений, с отдельными изменениями аналогичной величины наблюдавшимися нерегулярно в дни 7–10 в интервале 7–22 часов. Аналогично результатам, наблюдавшимся для DBP, незначительное снижение частоты сердечных сокращений наблюдалось при первой оценке (часы 1–4) по сравнению с

введением носителя. Различия не детектировались при промежуточных оценках и снова появлялись между часами 18–22 во все дни.

Кроме того, что касается результатов ЭКГ, не наблюдалось статистически значимых изменений интервала QTc в любой момент времени по сравнению с введением носителя. Хотя статистически значимые изменения RR, PR, RS и QT наблюдались на протяжении периода 14 дней по сравнению с носителем, они все были незначительными по абсолютной величине.

#### *Исследования безопасности с повторными дозами*

Исследование безопасности с повторными дозами включало 48 взрослых наивных по отношению к антителу G1 яванских макаков при равном соотношении полов (по 6 особей каждого пола в группе) (Charles River Primates). Животные получали носитель или антитело G1 в виде внутривенной инъекции раз в неделю в течение 14 недель в дозах 10 мг/кг, 100 мг/кг или 300 мг/кг. В каждой группе, двум животным, по одному каждого пола, давали дополнительно 4 месяца на восстановление после окончания введения доз.

Измерения ЭКГ и кровяного давления регистрировали один раз в фазе предварительных исследований, дважды после достижения стабильного состояния (до введения дозы и через 4 часа после введения дозы в день 85) и один раз около через 1 неделю после окончания введения доз (день 103 фазы восстановления). Животных анестезировали кетаминем и ЭКГ записывали с использованием восьми отведений. Измерения ЭКГ (включая частоту сердечных сокращений) проводили по собранным данным с использованием системы прикладных программ Life Science Suite Ponemah Physiology Platform через DSI, с использованием отведений I, II, aVF, CG4RL и CV4LL в качестве стандарта. Коррекцию на частоту сердечных сокращений для интервала QT (QTc) рассчитывали с использованием формулы Базетта.

Кровяное давление регистрировали перед первой дозой, после 12 недель введения доз (13 доз) и приблизительно через 1 неделю после завершения введения доз. Не было замечено значительных изменений значений SBP или DBP в любой из групп животных, получавших препарат, по сравнению с животными, получавшими носитель. Средние по группам частоты сердечных сокращений были относительно постоянными по группам дозировок и по моментам времени измерений, без выявленных статистических различий. Концентрации антитела G1 в плазме измеряли на

протяжении первой недели введения доз и во время определения кровяного давления и ЭКГ, и демонстрировали кумулятивный эффект при повторном еженедельном введении доз.

Кроме того, в отношении результатов ЭКГ, не наблюдалось значительных различий в значениях интервала QTc для всех доз и моментов времени.

Дополнительно, не наблюдалось никаких значительных или релевантных изменений ЭКГ по любому из параметров ЭКГ, анализируемых в ходе данных исследований.

В общем, антители G1 очень хорошо переносилось в обоих исследованиях, при этом не было замечено клинически значимых изменений любых гемодинамических параметров или любых релевантных изменений любых параметров ЭКГ. У яванских макак, долгосрочное ингибирование CGRP антителом G1 очевидно не влияло на сердечно-сосудистые и гемодинамические параметры.

Следует понимать, что примеры и варианты реализации, описанные в данном документе, служат только иллюстративным целям, и что, в свете этого, особы, квалифицированные в данной области техники, будут предвидеть различные модификации или изменения, которые должны быть включены в сущность и объем данной заявки. Все публикации, патенты и патентные заявки, упоминаемые в данном документе, настоящим включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме по существу в такой же степени, как если бы для каждой индивидуальной публикации, патента или патентной заявки было конкретно и индивидуально указано, что они таким образом включены в качестве ссылок.

### **Депонирование биологического материала**

Следующие материалы были депонированы в Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA (ATCC)):

<u>Материал</u>	<u>Антитело №</u>	<u>Номер доступа ATCC</u>	<u>Дата депонирования</u>
pDb.CGRP.hFcG1	тяжелая цепь G1	PTA-6867	15 июля 2005 г.
pEb.CGRP.hKGI	легкая цепь G1	PTA-6866	15 июля 2005 г.

Вектор pEb.CGRP.hKGI представляет собой полинуклеотид, кодирующий переменный участок легкой цепи G1 и константную область каппа-легкой цепи; и вектор pDb.CGRP.hFcG1 представляет собой полинуклеотид, кодирующий

вариабельную область тяжелой цепи G1 и константную область тяжелой цепи IgG2, содержащую следующие мутации: A330P331 на S330S331 (нумерация аминокислот в соответствии с последовательностью IgG2 дикого типа; см. Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624).

- 5 Указанное депонирование было проведено согласно положениям Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры и правилах его выполнения (Будапештский договор). Это обеспечивает сохранение жизнеспособной депонированной культуры в течение 30 лет с даты депонирования. Депонированный материал должен быть доступным через
- 10 ATCC согласно условиям Будапештского договора, и в соответствии с соглашением между Rinat Neuroscience Corp. и ATCC, которое обеспечивает постоянную и неограниченную доступность потомства депонированной культуры для публики после выдачи соответствующего патента США или после раскрытия для публики любой патентной заявки США или иностранной патентной заявки, в зависимости от того,
- 15 какая из них появится раньше, и гарантирует доступность потомства для особы, определенной комиссаром по патентам и торговым маркам США как имеющей право на это в соответствии с разделом 122 Свода законов США (35 USC Section 122) и правилами действия комиссара при этом (включая раздел 1.14 Свода федеральных постановлений США (37 CFR Section 1.14) с конкретной ссылкой на 886 OG 638).
- 20 Правопреемник данной заявки согласился с тем, что если культура депонированных материалов погибнет или будет утрачена или уничтожена при культивировании в пригодных условиях, то материалы будут немедленно заменены после получения уведомления на другие такие же. Доступность депонированных материалов не должна истолковываться как лицензия на практическую реализацию изобретения в нарушение
- 25 прав, предоставленных властью любого правительства в соответствии с его патентным законодательством.

### **Последовательности антител**

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи G1 (SEQ ID  
30 NO:1)  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDA  
SATHYAEAVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAЭДТАVYYCLAYFDYGLAIQNYW  
GQGTLVTVSS

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

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGI  
5 PARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIK

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

GFTFSNYWIS

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

EIRSESDASATHYAEAVKG

G1 CDR H3 (SEQ ID NO:5)

YFDYGLAIQNY

15

G1 CDR L1 (SEQ ID NO:6)

KASKRVTTYVS

G1 CDR L2 (SEQ ID NO:7)

GASNRYL

20

G1 CDR L3 (SEQ ID NO:8)

SQSYNYPYT

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

25 GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCTGC  
GTCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGTTTCACCTTCTCCAАCTACTGGATCTCCTGGGT  
CGTCAGGCTCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCGAATCCG  
ACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTTAAAGGTCGTTTCACCATCTCCCGT  
GACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTGCTGAAGACA  
30 CCGCTGTTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGTCTGGCTATCCAGAACTAC  
TGGGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCCTCC

Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи G1 (SEQ ID NO:10)

GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCAGGTGAACGTGCT  
 ACCCTGTCCTGCAAAGCTTCCAAACGGGTTACCACCTACGTTTCCTGGTACCAGCAG  
 5 AAACCCGGTCAGGCTCCTCGTCTGCTGATCTACGGTGCTTCCAACCGTTACCTCGGTA  
 TCCCAGCTCGTTTCTCCGGTTCGGTTCGGTACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTC  
 CCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTCAGTCCTACAACCTACCCCTA  
 CACCTTCGGTCAGGGTACCAAACCTGGAAATCAAA

10 Аминокислотная последовательность тяжелой цепи полного антитела G1 (включая модифицированный IgG2, как описано в данном документе) (SEQ ID NO:11)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDA  
 SATHYAEAVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAЭДТАVYYCLAYFDYGLAIQNYWG  
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG  
 15 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVEC  
 PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV  
 HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKG  
 QPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML  
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGI  
 PARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI  
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY  
 25 SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи полного антитела G1 (включая модифицированный IgG2, как описано в данном документе) (SEQ ID NO:13)

GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCTGC  
 30 GTCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGTTTCACCTTCTCCAACCTACTGGATCTCCTGGGTT  
 CGTCAGGCTCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCGAATCCG  
 ACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTAAAGGTCGTTTCACCATCTCCCG  
 TGACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTGCTGAAGAC

ACCGCTGTTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGTCTGGCTATCCAGAATA  
 CTGGGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCATCT  
 GTCTTCCCCTGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGG  
 GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCTGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGG  
 5 CGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGTCTC  
 TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCT  
 ACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTCGACAAGACCGTGG  
 AGAGAAAGTGTGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGCCCCTCCAGTGGCCGGACC  
 ATCCGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCCAGAACC  
 10 CCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGCAG  
 TTCAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGA  
 GAGGAGCAGTTCAACTCCACCTTCAGAGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTGCACC  
 AGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGACTGC  
 CATCCAGCATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCAC  
 15 AGGTGTATACCCTGCCCCATCCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC  
 TGACCTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTC  
 CAACGGACAGCCAGAGAACAATAAGACCACCCCTCCAATGCTGGACTCCGA  
 CGGATCCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAG  
 GGAAACGTGTTCTTCTTGTTCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATAACC  
 20 AGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCAGGAAAGTAA

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

GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCAGGTGAACGTG  
 CTACCCTGTCTGCAAAGCTTCCAAACGGGTACCACCTACGTTTCTGGTACCA  
 25 GCAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCGTCTGCTGATCTACGGTGCTTCCAACCGTTAC  
 CTCGGTATCCCAGCTCGTTTCTCCGGTTCGGTTCGGTACCGACTTCACCCTGAC  
 CATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTCAGTCCTAC  
 AACTACCCCTACACCTTCGGTCAGGGTACCAAACCTGGAAATCAAACGCACTGTG  
 GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCGGAA  
 30 CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCGCGCGAGGCCAAAGTACA  
 GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA  
 GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCCTGAGCAA

AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT  
GAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGCTAA

Сравнение аминокислотных последовательностей человеческого и крысиного CGRP  
5 (человеческий  $\alpha$ -CGRP (SEQ ID NO:15); человеческий  $\beta$ -CGRP (SEQ ID NO:43);  
крысиный  $\alpha$ -CGRP (SEQ ID NO:41); и крысиный  $\beta$ -CGRP (SEQ ID NO:44)):

NH<sub>2</sub>-ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF-CONH<sub>2</sub> (человеческий  
 $\alpha$ -CGRP)

10 NH<sub>2</sub>-ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKS NFVPTNVGSKAF-CONH<sub>2</sub> (человеческий  
 $\beta$ -CGRP)

NH<sub>2</sub>-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSEAF-CONH<sub>2</sub> (крысиный  $\alpha$ -  
CGRP)

15 NH<sub>2</sub>-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSKAF-CONH<sub>2</sub> (крысиный  $\beta$ -  
CGRP)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи LCVR17  
(SEQ ID NO: 58)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSEYHSG  
VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQGDALPPTFGQGTKLEIK

20 Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HCVR22  
(SEQ ID NO: 59)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFGN YWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE  
GTG DTRYIQKFAGRV TMTRDTSTSTVY MELSS LRSЭДТАVYYCARLSDYVSGFSYW  
25 GQGLVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи LCVR18  
(SEQ ID NO: 60)

30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSEYHSG  
VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQGDALPPTFGQGTKLEIK

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HCVR23  
(SEQ ID NO: 61)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGNWYMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE  
 GTGKTVYIQKFAGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSЭДТАVYYCARLSDYVSGFSYW  
 GQGTLVTVSS

5

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи LCVR19  
 (SEQ ID NO: 62)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSGYHSG  
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGDALPPTFGGGTKVEIK

10

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HCVR24  
 (SEQ ID NO: 63)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFGNWYMQWVRQAPGQGLEWMGAIYEG  
 TGKTVYIQKFADRVTITADKSTSTAYMELSSLRSЭДТАVYYCARLSDYVSGFGYW

15

QGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи LCVR20  
 (SEQ ID NO: 64)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIDKYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSEYHSGV  
 PSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQGDALPPTFGQGKLEIK

20

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HCVR25  
 (SEQ ID NO: 65)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGNWYMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE  
 GTGKTVYIQKFAGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSЭДТАVYYCARLSDYVSGFGYW  
 GQGTLVTVSS

25

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи LCVR21  
 (SEQ ID NO: 66)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDKYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSGYHSG  
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGDALPPTFGGGTKVEIK

30

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HCVR26  
(SEQ ID NO: 67)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFGNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYEG  
TGKTVYIQKFAGRVTITADKSTSTAYMELSSLRСЭДТАVYYCARLSDYVSGFGYWG  
5 QGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи LCVR27  
(SEQ ID NO: 68)

QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYHNTYLAWYQKPGKVPKQLIYDASTLAS  
10 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIKR

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HCVR28  
15 (SEQ ID NO: 69)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYMNWVRQAPGKGLEWVGVINGA  
TYYASWAKGRFTISRDN SKTTVY LQMNSLRAЭДТАVYFCARGDIWGQGLTVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи LCVR29  
20 (SEQ ID NO: 70)

QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYDNNYLAWYQKPGKVPKQLIYSTSTLAS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCFVFGGGTKVEIKR

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HCVR30  
25 (SEQ ID NO: 71)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGIND  
NTYYASWAKGRFTISRDN SKTTVY LQMNSLRAЭДТАVYFCARGDIWGQGLTVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи LCVR31  
30 (SEQ ID NO: 72)

QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYDNNYLAWYQKPGKVPKQLIYSTSTLAS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCFVFGGGTKVEIKR

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HCVR32  
(SEQ ID NO: 73)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGIND  
5 NTYYASWAKGRFTISRDN SKTTVY LQMNSLRAЭДТАVYFCARGDIWGQGLTVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи LCVR33  
(SEQ ID NO: 74)

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGQPPKQLIYDASTLAS  
10 GVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCNDAAAYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTEVVVKR

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HCVR34  
(SEQ ID NO: 75)

15 QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCSVSGIDLSGYMNVWRQAPGKGLEWIGVIGINGATY  
YASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTЭДТАTYFCARGDIWGPGTLTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи LCVR35  
(SEQ ID NO: 76)

20 QVLTQSPSSLSASVGDRTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGKVPKQLIYDASTLAS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIKR

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HCVR36  
(SEQ ID NO: 77)

25 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYMNVWRQAPGKGLEWVGVIGINGA  
TYIASWAKGRFTISRDN SKTTVY LQMNSLRAЭДТАVYFCARGDIWGQGLTVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи LCVR37  
(SEQ ID NO: 78)

30 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSG  
IPDRFSGSKSGTSTTLGITGLQTGDEADYYCGTWDSRLSAVVFGGGTKLTVL

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи HCVR38

(SEQ ID NO: 79)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGS

IKYSVDSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAЭДТАVYYCARDRLNYYDSSGYYHY

5 KYYGMAVWGQGTTVTVSS

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или снижения частоты случаев головной боли у субъекта, включающий введение субъекту каждые три месяца дозы моноклонального антитела, которое ингибирует путь пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP), причем указанная доза, которую вводят каждые три месяца, составляет от 100 до 2000 мг, и при этом моноклональное антитело содержит CDR H1, представленный в SEQ ID NO:3, CDR H2, представленный в SEQ ID NO:4, а CDR H3, представленный в SEQ ID NO:5; CDR L1, представленный в SEQ ID NO:6; CDR L2, представленный в SEQ ID NO:7 и CDR L3, представленный в SEQ ID NO:8.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что головная боль представляет собой мигрень.
3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что мигрень представляет собой хроническую мигрень.
4. Способ по п. 2, отличающийся тем, что мигрень представляет собой эпизодическую мигрень.
5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что частота головной боли снижается на по меньшей мере семь дней после разового введения.
6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что месячное количество часов головной боли, испытываемой субъектом, снижается после указанного введения на 40 или более часов по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения.
7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что месячное количество дней головной боли, испытываемой субъектом, снижается после указанного введения на 3 или более дней по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения.
8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что месячное количество часов головной боли, испытываемой субъектом, снижается после указанного введения на 25% или более, по сравнению с уровнем, наблюдавшимся у субъекта до введения.
9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что введение представляет собой подкожное или внутривенное введение.

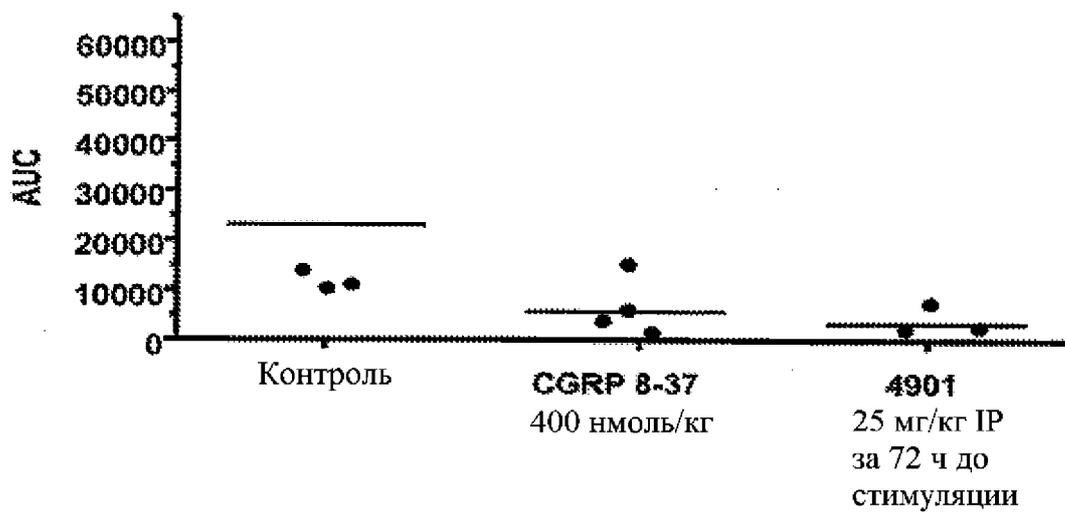
10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что введение включает использование предварительно наполненного шприца, содержащего указанное количество моноклонального антитела.
11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что композицию моноклонального антитела готовят в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл.
12. Способ по п. 1, включающий введение субъекту второго агента одновременно или последовательно с моноклональным антителом.
13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что второй агент выбирают из группы, состоящей из: агонистов 5-HT<sub>1</sub>, триптанов, алкалоидов спорыньи и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств.
14. Способ по п. 12, отличающийся тем, что месячное применение второго агента субъектом снижается на по меньшей мере 15% после введения моноклонального антитела.
15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что второй агент представляет собой триптан.
16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что субъект является человеком.
17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным.
18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что доза, вводимая каждые три месяца, составляет 675 мг.
19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что дозу, составляющую 675 мг, вводят в виде трех инъекций по 225 мг каждая.
20. Способ по п. 19, где каждая инъекция по 225 мг составляет 1,5 мг.
21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что инъекции представляют собой подкожные инъекции.
22. Способ по п. 19, отличающийся тем, что инъекции представляют собой инъекции в живот, бедро или верхнюю часть плеча тела субъекта.

23. Способ по п. 1, отличающийся тем, что доза, которую вводят каждые три месяца, составляет 675 мг, и при этом указанную дозу 675 мг вводят в виде трех последовательных подкожных инъекций по 225 в 1,5 мл в живот, бедро или верхнюю часть плеча тела субъекта.

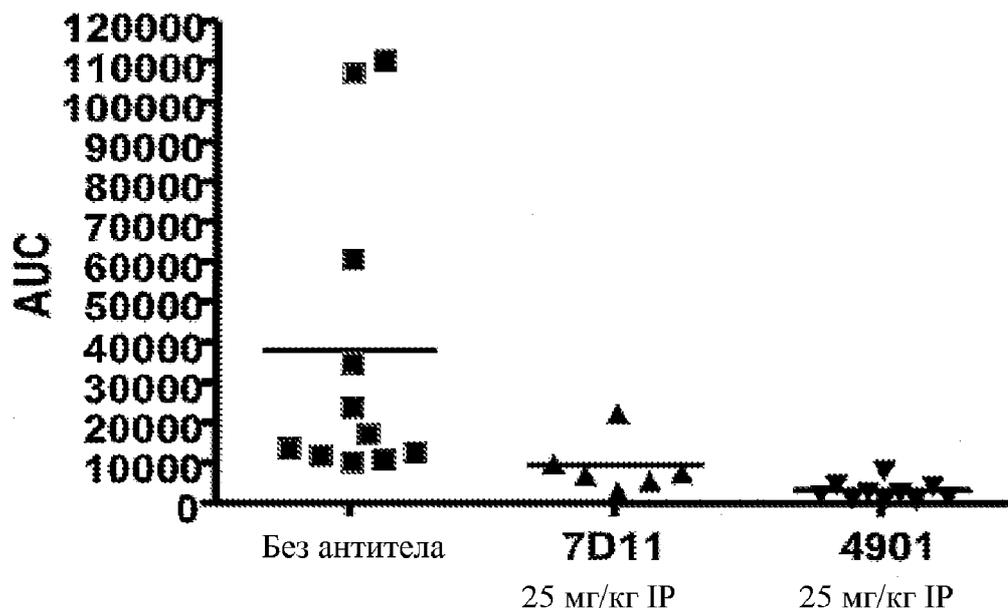
24. Применение моноклонального антитела, которое ингибирует путь пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP), для производства лекарственного средства лечения или снижения частоты случаев головной боли у субъекта, причем указанное моноклональное антитело содержит CDR H1, представленный в SEQ ID NO:3, CDR H2, представленный в SEQ ID NO:4, CDR H3, представленный в SEQ ID NO:5; CDR L1, представленный в SEQ ID NO:6; CDR L2, представленный в SEQ ID NO:7, и CDR L3, представленный в SEQ ID NO:8, и указанное лечение или снижение частоты включает введение субъекту каждые три месяца дозы указанного антитела, где доза, которую вводят каждые три месяца, составляет от 100 до 2000 мг.

25. Применение моноклонального антитела, которое ингибирует путь пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP), для лечения или снижения частоты случаев головной боли у субъекта, причем указанное моноклональное антитело содержит CDR H1, представленный в SEQ ID NO:3, а CDR H2, представленный в SEQ ID NO:4, а CDR H3, представленный в SEQ ID NO:5; а CDR L1, представленный в SEQ ID NO:6; а CDR L2, представленный в SEQ ID NO:7, и CDR L3, представленный в SEQ ID NO:8, и указанное применение включает введение субъекту каждые три месяца дозы антитела, где доза, которую вводят каждые три месяца, составляет от 100 до 2000 мг.

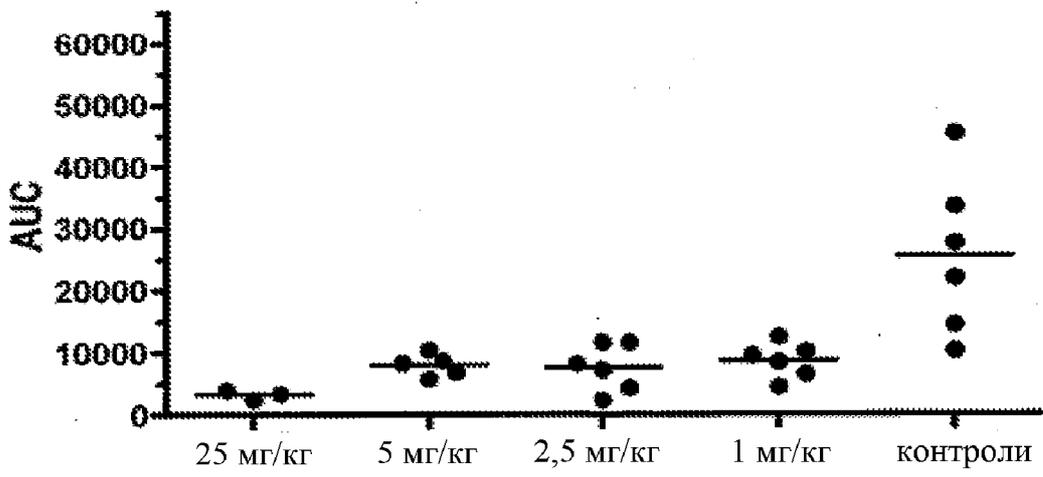




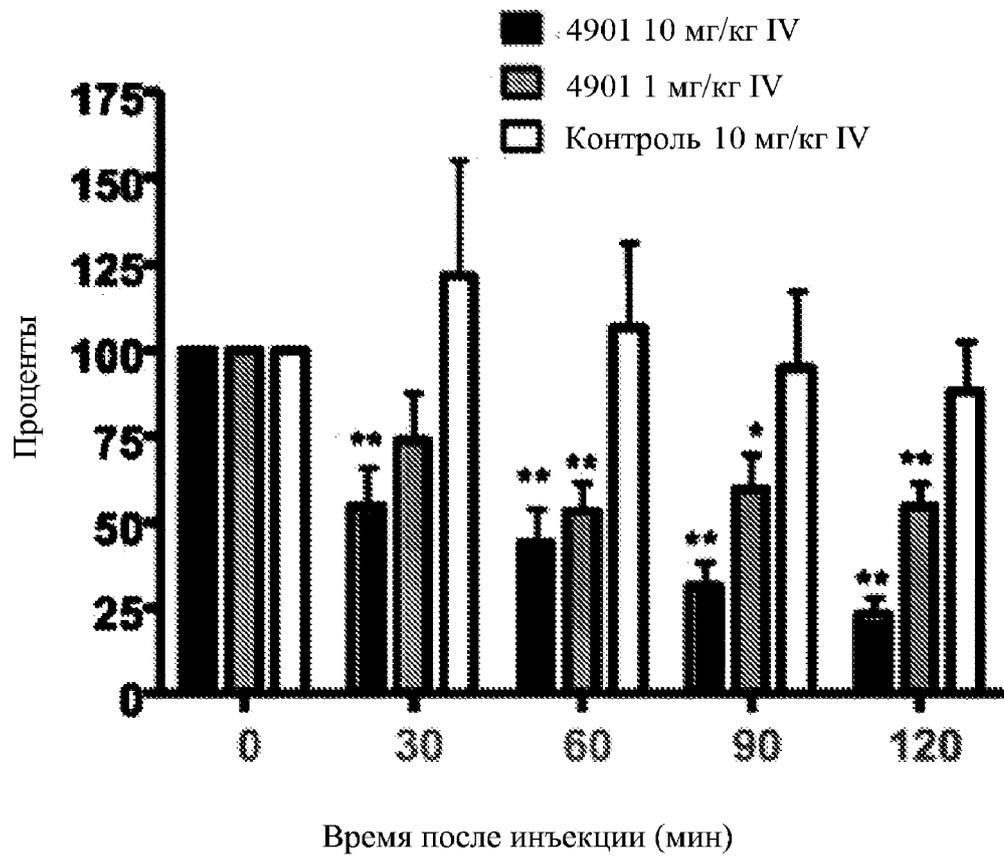
ФИГ. 2А



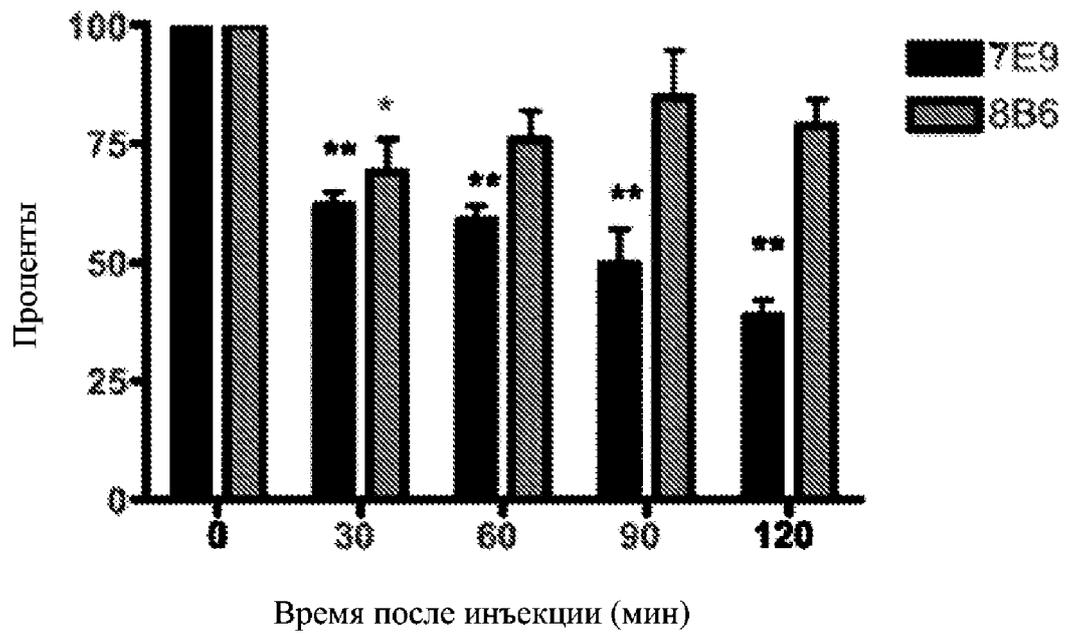
ФИГ. 2В



ФИГ. 3



ФИГ. 4А



ФИГ. 4В

**Выделено жирным шрифтом - CDR по Kabat**  
**Выделено подчеркиванием - CDR по Chotia**

Тяжелая цепь G1

```

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

```

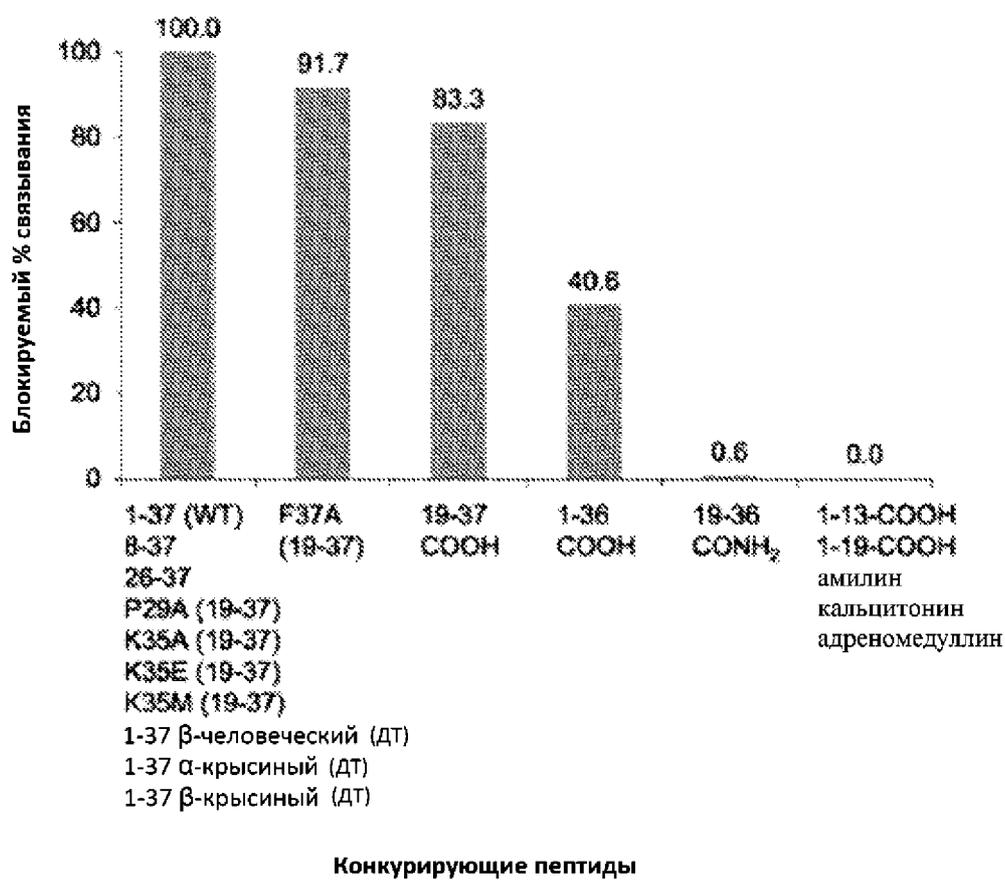
Легкая цепь G1

```

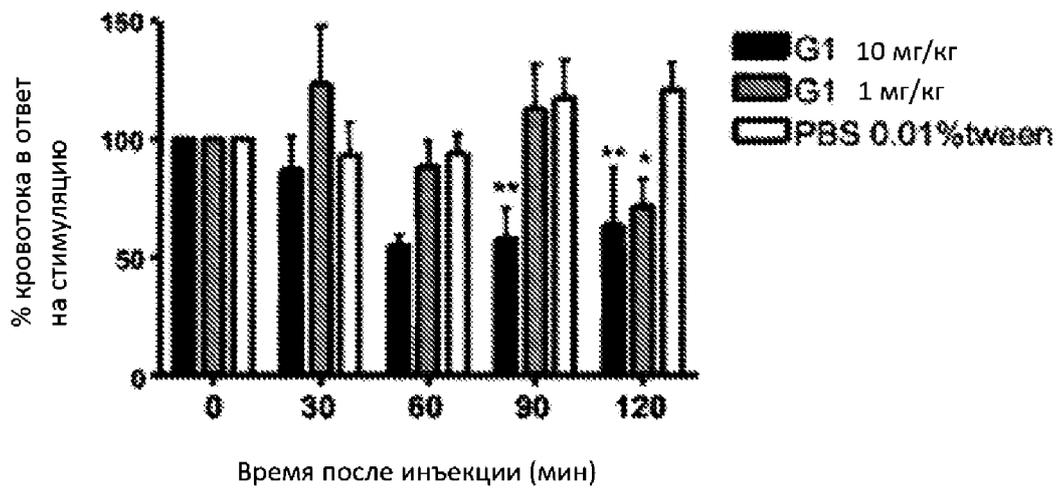
1          5          10          15          20          25          30
E I V L I Q S P W T L S L S P G E R R A T L S C K A S K R V T
                                     L1
31          35          40          45          50          55          60
T Y V S K Y C Q K P G Q A P R L L I Y G A S N R Y L G I P A
                                     L2
61          65          70          75          80          85          90
E P Q Q S C Q T D P W L P I S S L E P S D P A V Y Y C S Q
                                     L3
91          95          100          105          110
S Y W Y R X M P Q Q G T K L E I K

```

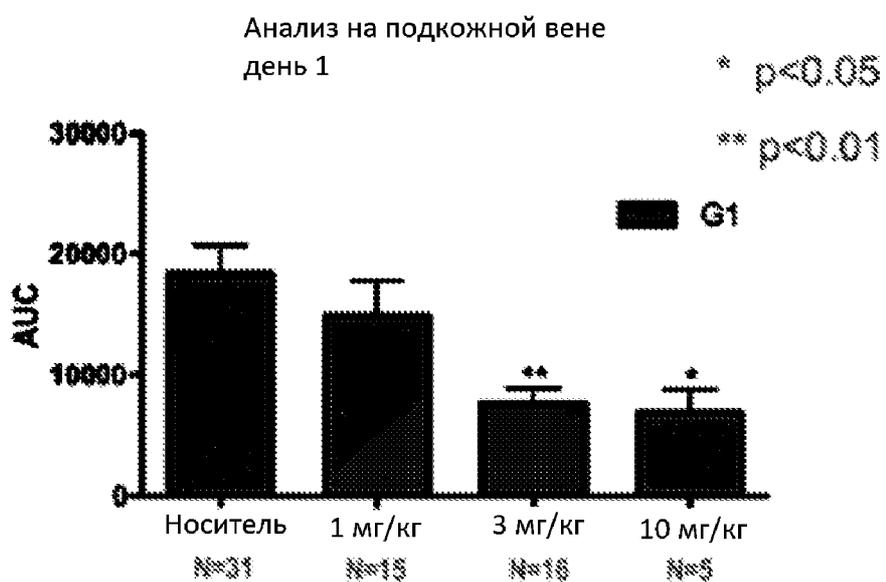
ФИГ. 5



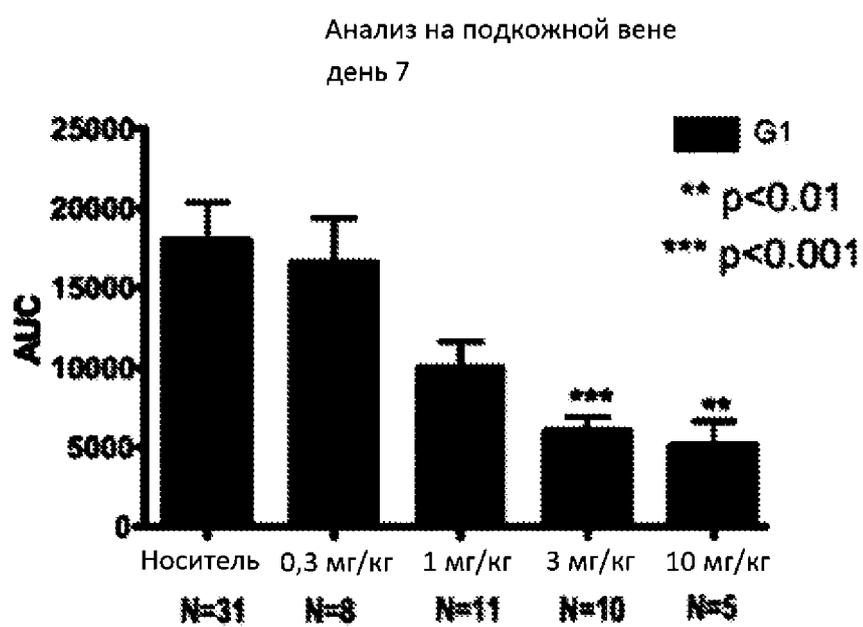
ФИГ. 6



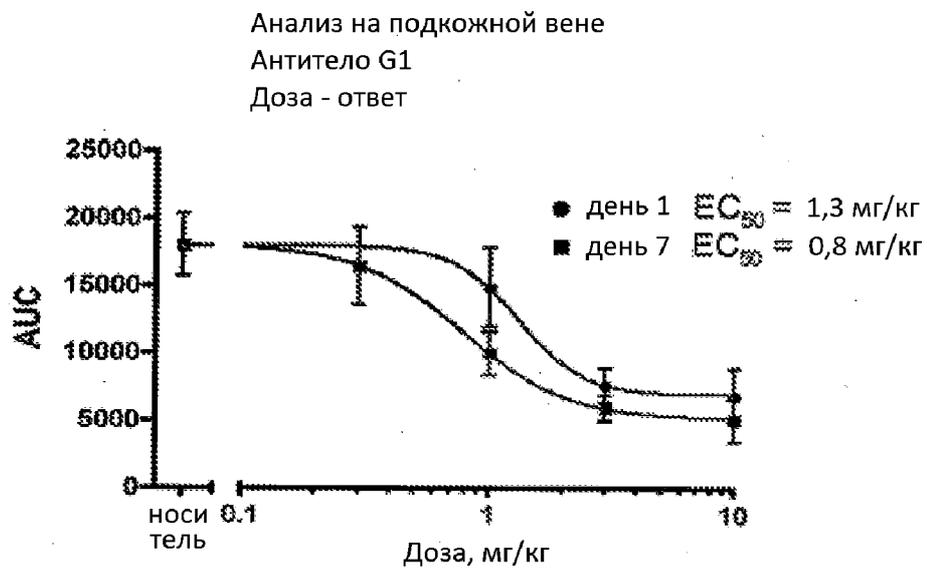
ФИГ. 7



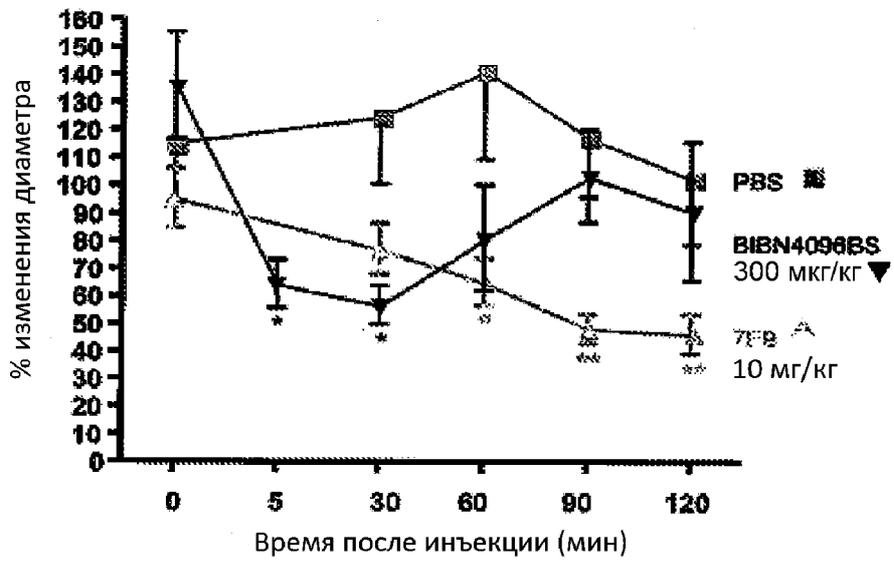
ФИГ. 8А



ФИГ. 8В



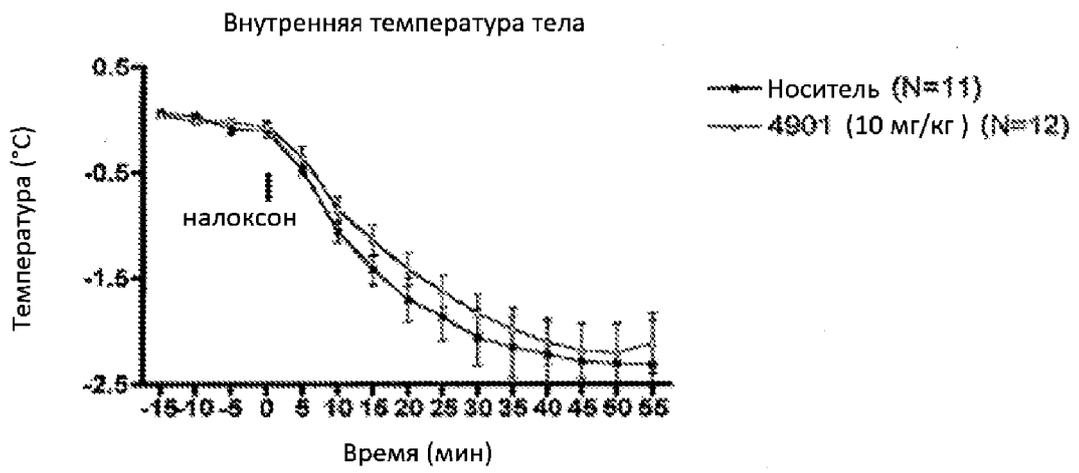
ФИГ. 8С



ФИГ. 9



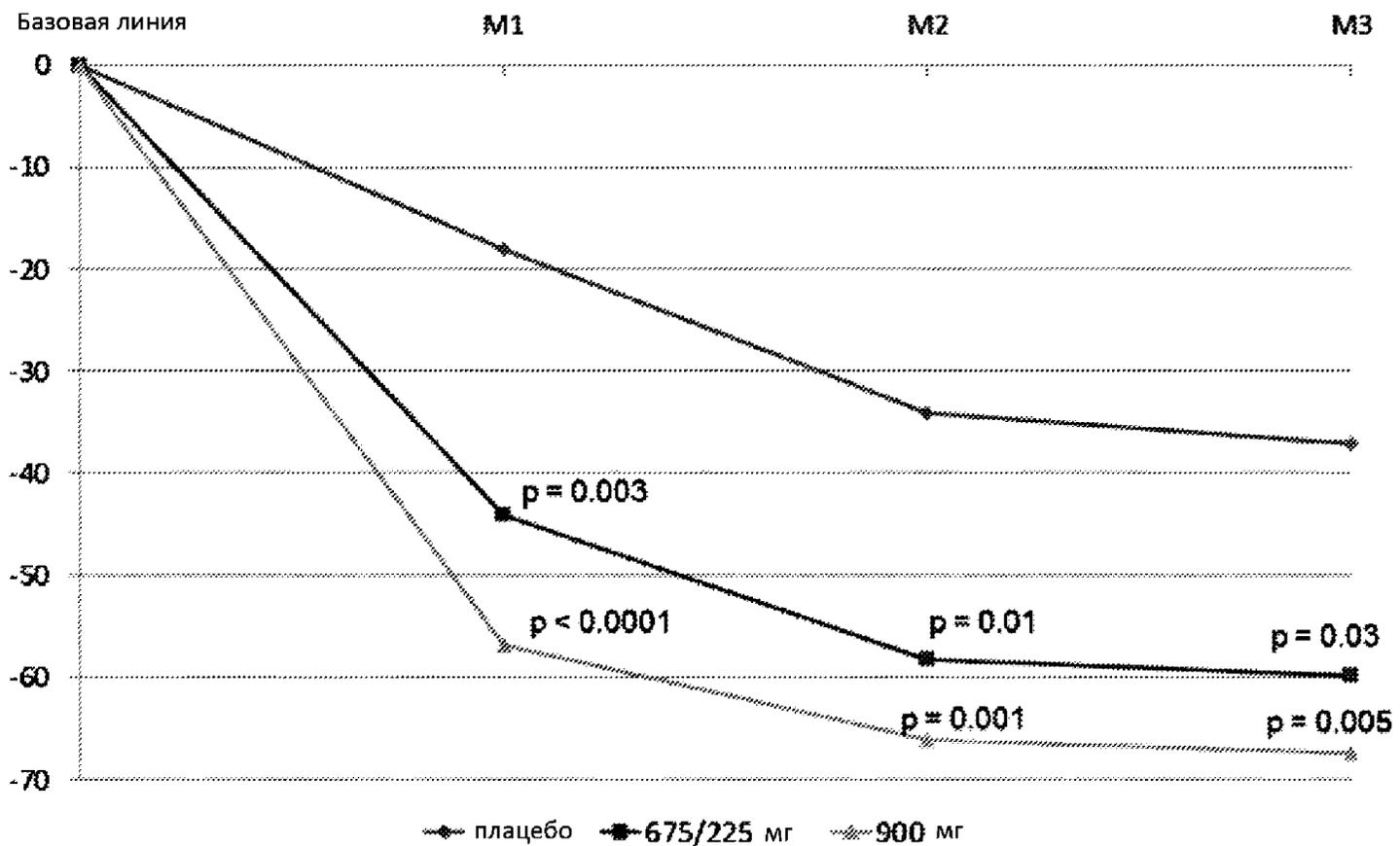
ФИГ. 10



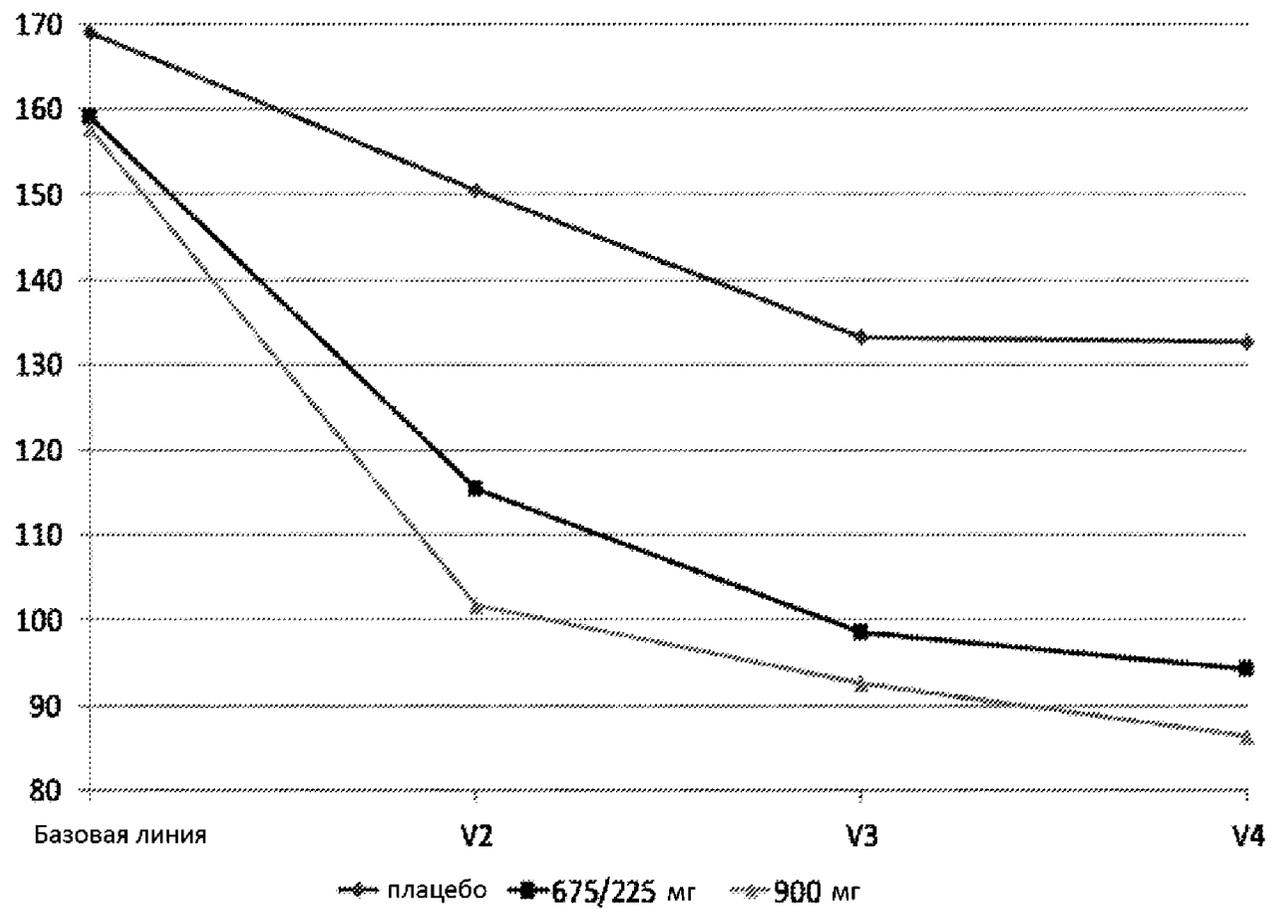
ФИГ. 11А



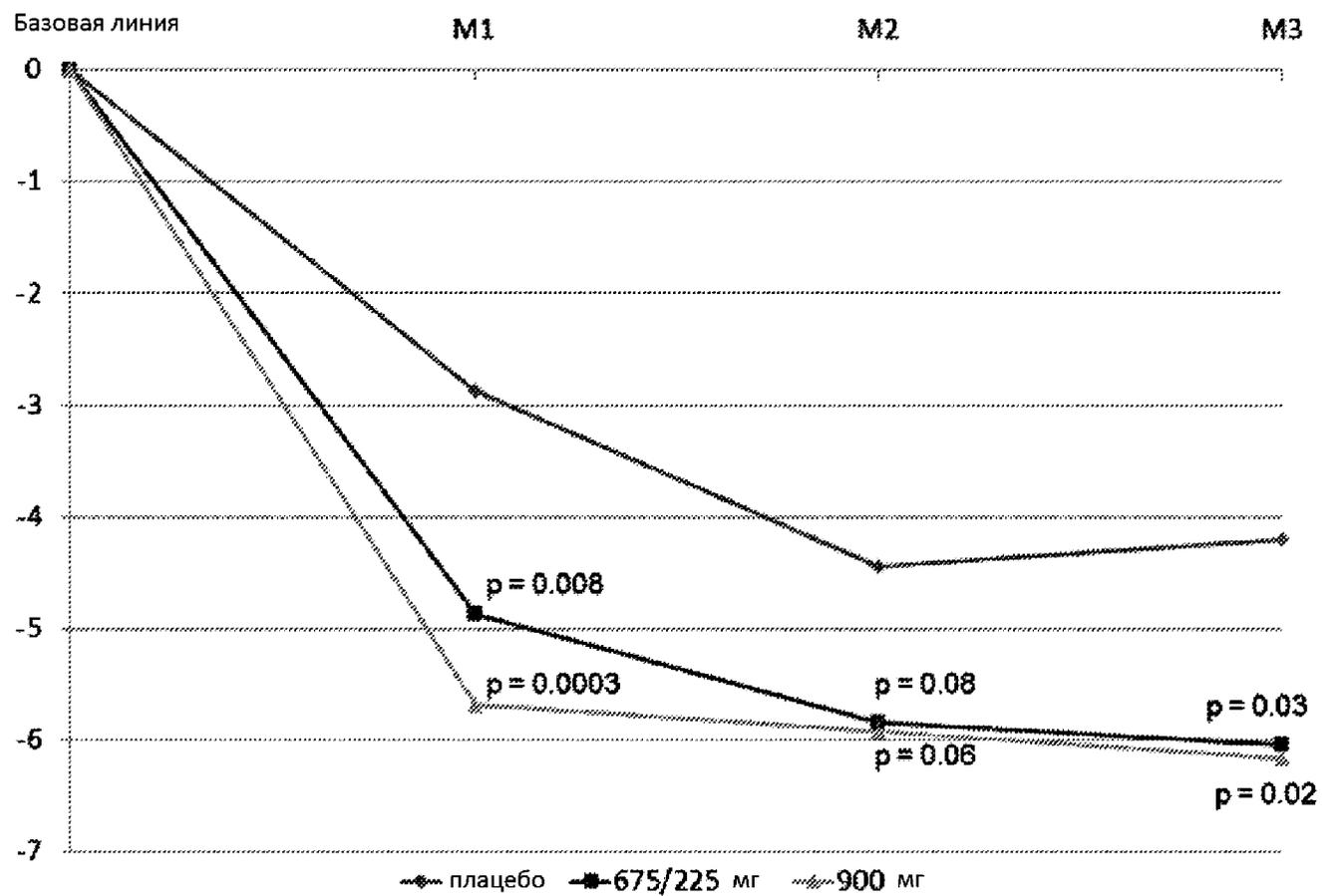
ФИГ. 11В



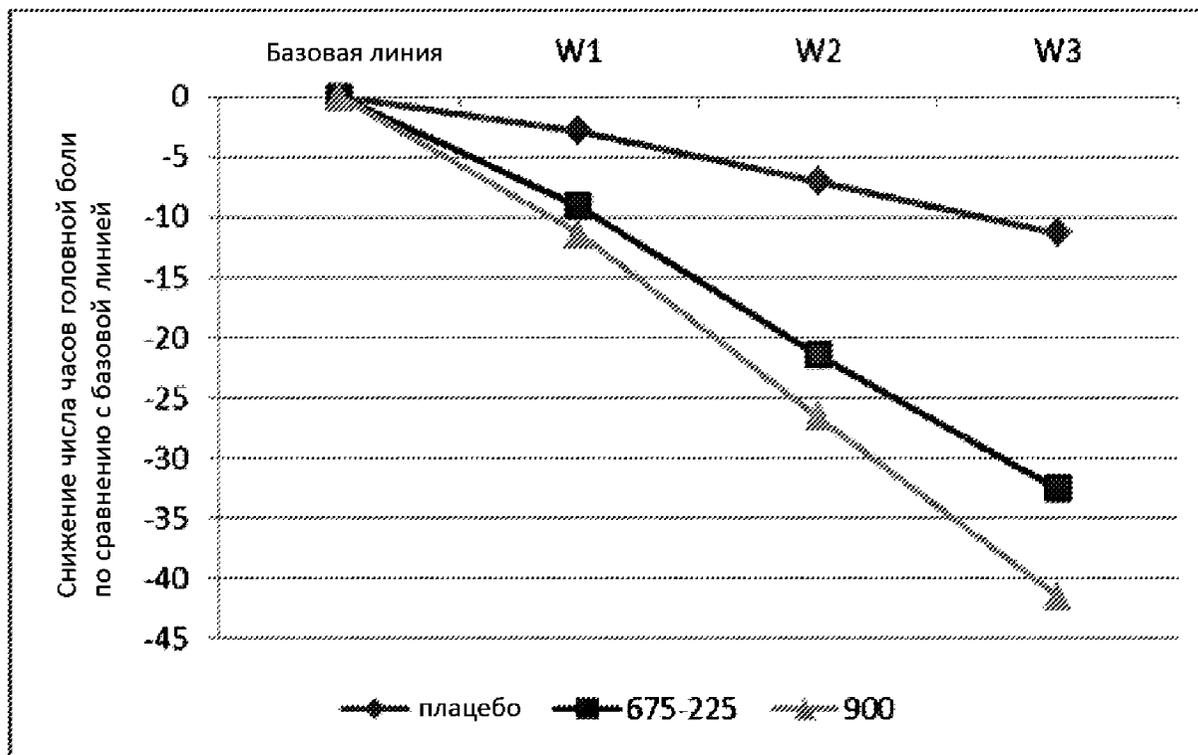
ФИГ. 12



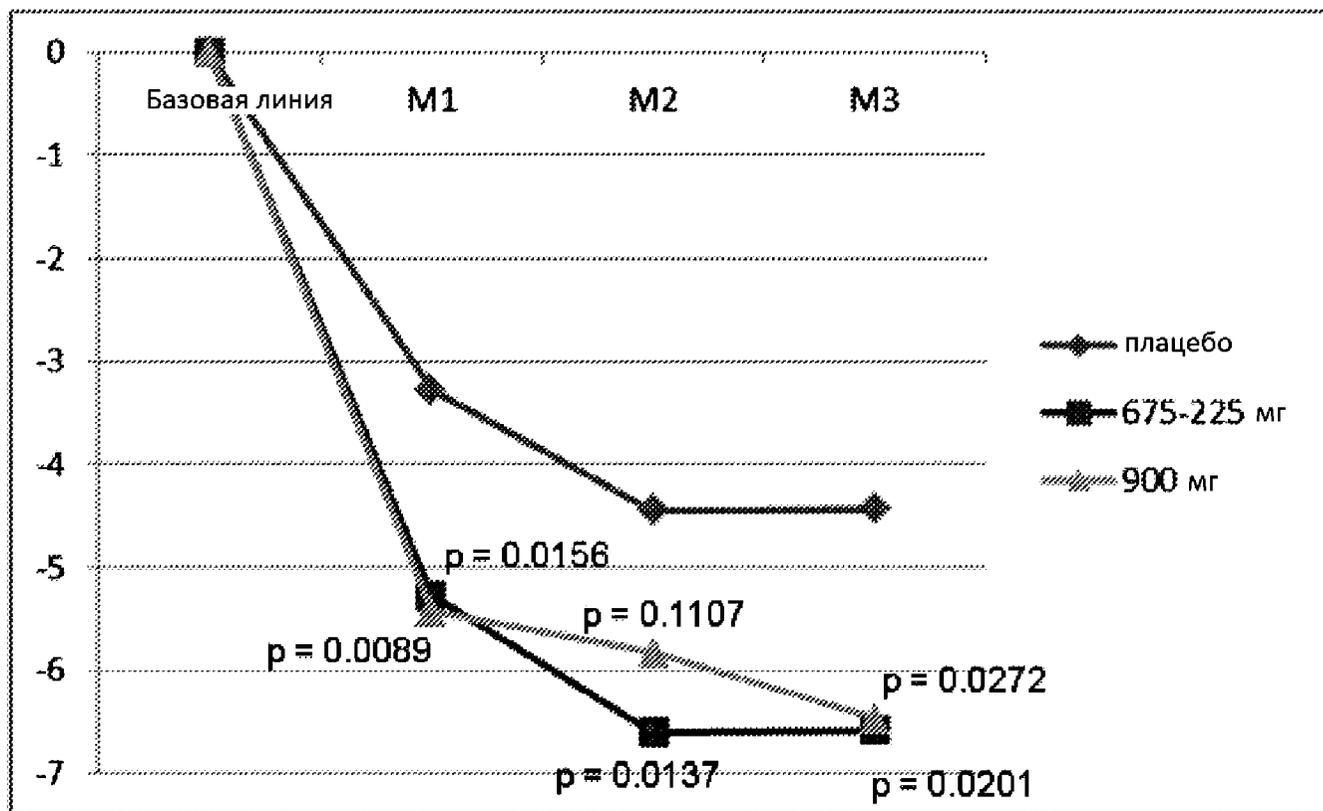
ФИГ. 13



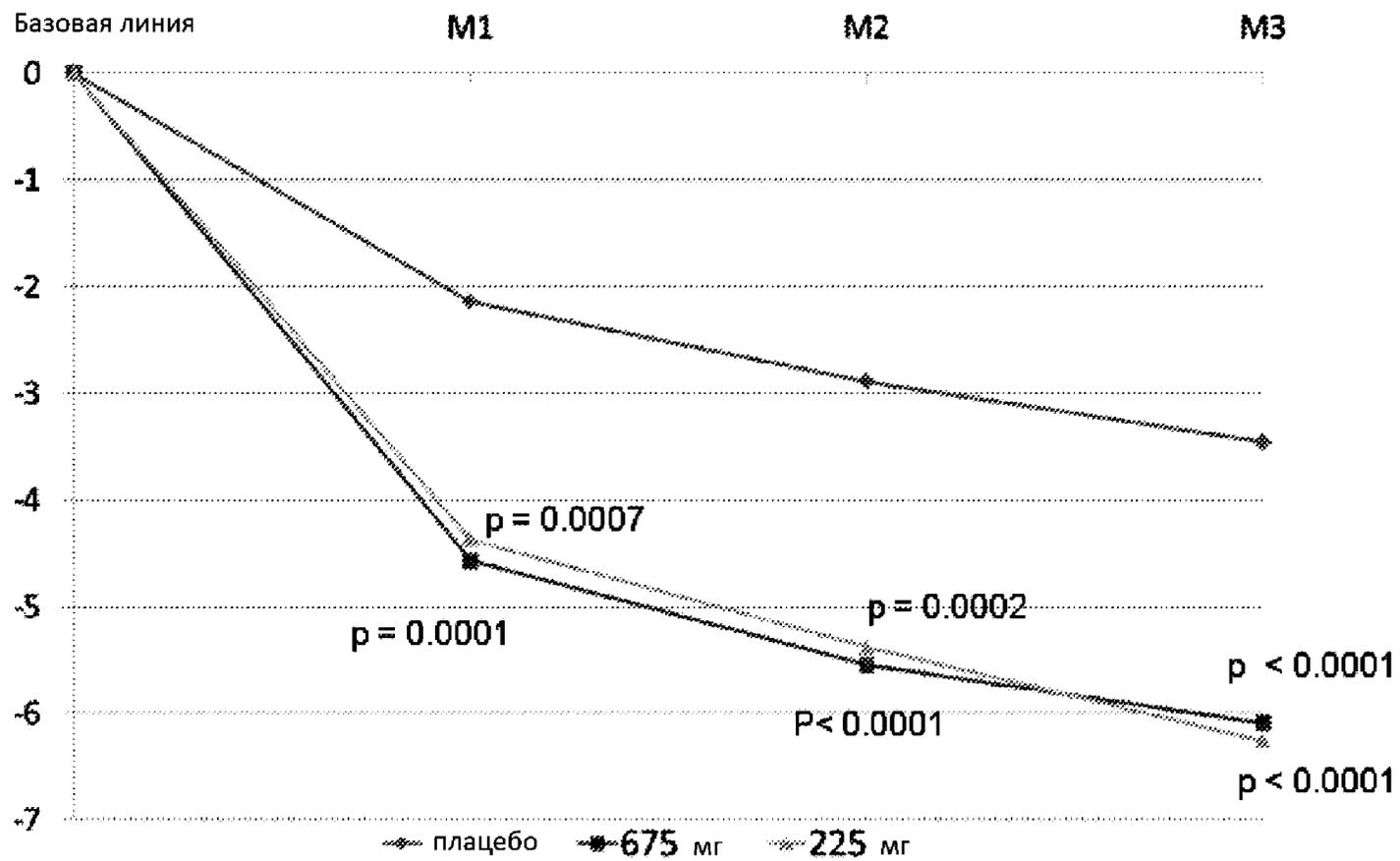
ФИГ. 14



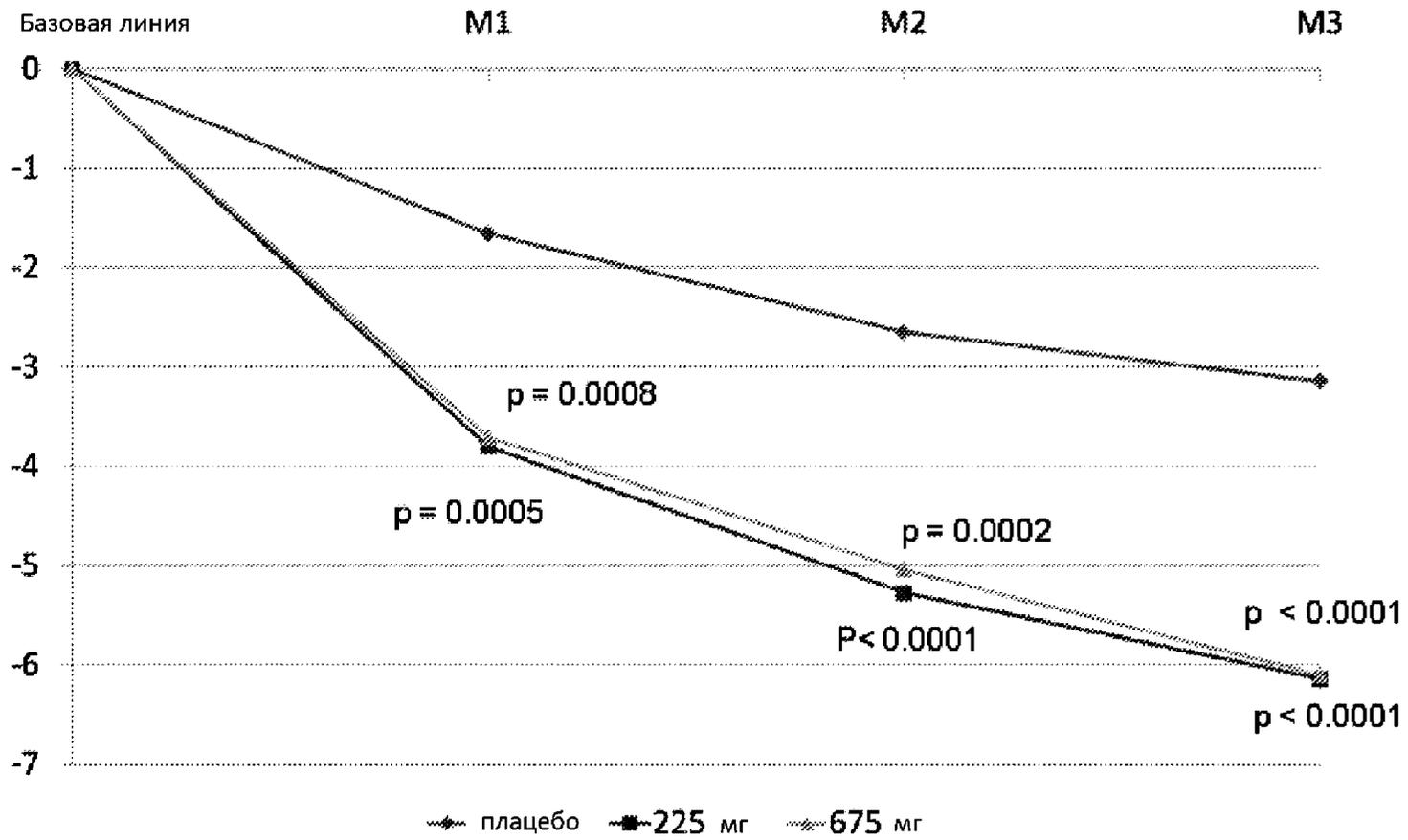
ФИГ. 15



ФИГ. 16



ФИГ. 17



ФИГ. 18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/021887

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/395 (2015.01) CPC - C07K 16/26 (2015.04) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 31/00, 39/00, 39/395; A61P 5/00, 5/24, 9/00, 25/00; C07K 16/00, 16/18, 16/26; C12N 15/09, 15/63; C12P 21/08 (2015.01) USPC - 424/133.1; 530/389.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 2039/505; C07K 16/18, 16/26, 2316/96, 2317/24, 2317/34, 2317/55, 2317/565, 2317/56, 2317/76, 2317/92 (2015.04) (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Google Scholar. Search terms used: migraine headache CGRP OR CALCITONIN GENE RELATED PEPTIDE antagonist monoclonal antibody humanized triptan		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/0216535 A1 (LABRYS BIOLOGICS, INC) 22 August 2013 (22.08.2013) entire document	1-42
A	US 2010/0172895 A1 (BOONE et al) 08 July 2010 (08.0-7.2010) entire document	1-42
A	WO 2007/076336 A1 (ELI LILLY AND COMPANY) 5 July 2007 (05.07.2007) entire document	1-42
A	SILBERSTEIN, S. "Emerging Target-Based Paradigms to Prevent and Treat Migraine" Clinical Pharmacology & Therapeutics, 05 December 2012 (05.12.2012), Vol. 93, No. 1, Pgs. 78-85. entire document	1-42
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 June 2015		Date of mailing of the international search report 08 JUL 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. :

PCT/US2015/021887

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 43  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.